



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Artrite Reumatoide
Impacto da terapêutica com agentes biológicos nos
parâmetros clínicos e laboratoriais

Ana Alexandra Chegão Pissarra Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a Doutora Ana Mafalda Loureiro Fonseca
Coorientador: Dr. Paulo Manuel Tavares Vicente Beja Ratado

Covilhã, outubro de 2013

*“Todas as verdades são simples de compreender
quando são descobertas; a questão é descobri-las.”*

Galileu

Agradecimentos

A conceção de uma dissertação exige uma grande dedicação e um árduo trabalho e empenho pessoal, e considero que para a sua concretização, a inspiração, a paciência, a curiosidade e a reflexão têm de estar presentes ao longo de todo o percurso. No entanto, este é um produto do trabalho de equipa, sem a qual não seria concretizável, e de um forte apoio psicológico e emocional. Por estes motivos, eu quero agradecer e dedicar este trabalho a todos os que me ajudaram neste projeto.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Mafalda Fonseca, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela sua disponibilidade e pelo seu apoio constante e incondicional, pela transmissão de conhecimentos científicos e constante incentivo à descoberta e por todas as oportunidades que me deu ao longo deste anos, que contribuíram, sem dúvida, tanto para a minha formação pessoal como para a minha formação académica.

Em segundo lugar, quero agradecer ao meu coorientador, Dr. Paulo Tavares, pela sua disponibilidade, transmissão de conhecimentos, constante incentivo à descoberta e pela extraordinária motivação.

Quero também agradecer ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e à Unidade Local de Saúde da Guarda pela oportunidade de realizar este projeto e às médicas especialistas do serviço de Doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda, Doutora Joana Vedes, Doutora Cristina Sequeira, Doutora Cláudia Vaz e Doutora Nadejda Potlog, pela sua disponibilidade e consentimento para a consulta dos processos clínicos dos doentes seguidos neste serviço.

Além disso, tenho de agradecer, do fundo do meu coração, a todos os meus amigos, especialmente à Cláudia Esteves, ao Hugo Silva, à Michelle Gonzalez, à Ana Rita Fonseca e aos meus colegas, especialmente à Marina Guerra e à Agustina Bessa pelo apoio constante e incondicional, pela paciência, pela força e coragem transmitida, pela disponibilidade e acima de tudo pela amizade e pelo carinho.

Quero deixar um agradecimento muito especial à Carina Peres, que é muito mais que uma colega de curso, é uma amiga, com a qual partilhei muitos momentos durante o meu percurso académico e que me deu um grande suporte emocional, pela compreensão, paciência, pelo apoio e pela disponibilidade constante e um grande apoio científico nesta fase da minha vida.

Tenho também de agradecer às minhas colegas de casa, Marta Gonçalves, Mónica Silva e Maria Inês Gonçalves por todo o carinho, compreensão, companhia, ajuda e paciência demonstrados durante esta etapa.

Queria agradecer, do fundo do meu coração, aos meus pais e aos meus irmãos por todo o amor, apoio, carinho, paciência e confiança que sempre me deram. Agradeço-lhes por tudo o que sou hoje e por tudo aquilo que conquistei. Sem eles nada disto seria possível.

Muito obrigada a todos!

Resumo

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória crónica sistémica, de etiologia desconhecida e está associada à incapacidade progressiva, complicações sistémicas, morte prematura e elevados custos socioeconómicos. O tratamento farmacológico da AR pode ser realizado em monoterapia ou em combinação e inclui o uso de anti-inflamatórios não-esteroides, glucocorticoides e fármacos antirreumáticos modificadores da evolução da doença. Nas últimas décadas surgiram os fármacos biológicos e estes vieram revolucionar o tratamento das doenças autoimunes, nomeadamente a AR. Este projeto de investigação é num estudo retrospectivo desde o ano de 2008, até ao presente ano e a amostra inicial todos os doentes com AR, seguidos nas Consultas de Doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar o impacto da terapêutica com agentes biológicos no *Disease Activity Score* (DAS28) e em diferentes parâmetros laboratoriais em doentes com AR. Procedeu-se a uma análise dos perfis de evolução da doença e das correlações entre o DAS28 e diferentes parâmetros laboratoriais. Os parâmetros laboratoriais foram analisados no Laboratório de Análises Clínicas do Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda de acordo com as normas e critérios definidos para a avaliação de cada parâmetro. Concluiu-se que a terapêutica convencional e a terapêutica biológica apresentam uma eficácia semelhante, nomeadamente no que diz respeito ao DAS28 e também à generalidade dos parâmetros laboratoriais avaliados. No entanto, no que diz respeito à sintomatologia, o tratamento com fármacos biológicos conduz a melhorias significativas, com um aumento global da qualidade de vida dos doentes. O estudo da evolução do DAS28 e de parâmetros laboratoriais ao longo do tempo permitiu observar a variabilidade interindividual existente nos doentes com AR, o que pressupõe a prática de uma “medicina personalizada”. No que diz respeito à correlação entre parâmetros observou-se que existe uma correlação positiva entre o DAS28 e a velocidade de sedimentação e uma correlação negativa entre o DAS28 e a hemoglobina nos grupos analisados. Relativamente aos parâmetros imunológicos e à sua correlação com o DAS28, os resultados sugerem que estes parâmetros não apresentam capacidade de prognóstico da doença e monitorização da terapêutica. Em suma, do ponto de vista dos parâmetros laboratoriais e do DAS28 não se observa um impacto significativo do tratamento com fármacos biológicos.

Palavras-chave

Artrite Reumatoide, tratamento convencional, terapêutica com fármacos biológicos, parâmetros hematológicos e imunológicos.

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory autoimmune disease, with unknown etiology and it is associated with progressive disability, systemic complications, early death and high socioeconomic costs. Pharmacological treatment of RA can be performed alone or in combination and includes the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids and disease-modifying antirheumatic drugs. In the latest decades, biological drugs have emerged and these drugs have revolutionized the treatment of autoimmune diseases, particular RA. This research project was a retrospective study from the year 2008 until the present year and the initial sample have included all RA patients, followed in Consultas de Doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda. Therefore, the present study aimed to analyze the impact of therapy with biological agents in the Disease Activity Score (DAS28) and in different laboratory parameters in patients with RA. Additionally we performed an analysis of the profiles of the disease and correlations between DAS28 and various laboratory parameters. Laboratory parameters were analyzed in the Laboratório de Análises Clínicas do Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda according to the standards and criteria for the evaluation of each parameter. We concluded that conventional therapy and biological therapy have similar efficacy, particularly with regard to the DAS28 and also to most of the laboratory parameters. However, with regard to the physical symptoms of RA, treatment with biological agents leads to significant improvement, with an overall increase in the quality of life of patients. The detailed study of the evolution of the DAS28 and laboratory parameters showed the interindividual variability in patients with RA, which requires the commission of a "personalized medicine". With regard to the correlation between the parameters, we observed that there is a positive correlation between the DAS28 and sedimentation and a negative correlation between the DAS28 and haemoglobin in the control group and study group, respectively. Regarding the immunological parameters and their correlation with DAS28, the results suggest that these parameters do not have the ability to prognosis and monitoring of therapy. In summary, from the viewpoint of laboratory parameters and DAS28 there is not observed a significant impact of the treatment with biological agents. However, there is a growing need for finding a predictive biomarker which allows to efficient monitoring of the therapy.

Keywords

Rheumatoid Arthritis, conventional therapy, biological therapy, haematological and immunological parameters.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	viii
Abstract	x
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Gráficos	xx
Lista de Acrónimos	xxiii
I. Introdução.....	1
1. Sistema esquelético - Articulações Sinoviais	1
1.1. Anatomia	2
1.2. Histologia	3
1.3. Fisiologia	4
1.4. Composição da matriz extracelular articular.....	4
2. Artrite Reumatoide.....	5
2.1. Epidemiologia	6
2.2. Diagnóstico	6
2.2.1 Características clínicas.....	8
2.2.2 Auto-anticorpos.....	9
2.3. Etiologia.....	11
2.3.1 Fatores genéticos.....	12
2.3.2 Fatores ambientais.....	13
2.4. Tratamento.....	13
2.5. Fisiopatologia	14
2.5.1 Alterações histológicas	18
2.5.2 Danos estruturais	19
2.5.3 Consequências sistêmicas.....	20
3. Terapêutica Biológica.....	22
3.1 Antagonistas do TNF- α	25

3.1.1	Infliximab	27
3.1.2	Etanercept.....	28
3.1.3	Adalimumab	28
3.1.4	Certolizumab Pegol	29
3.1.5	Golimumab	29
3.2	Antagonistas da IL-6 - Tocilizumab.....	30
3.3	Antagonistas da IL-1 - Anakinra	31
3.4	Inibidores de linfócitos B - Rituximab.....	31
3.5	Bloqueadores da ativação linfócitos T - Abatacept.....	32
3.6	Eficácia.....	33
3.7	Segurança e Imunotoxicidade	34
3.8	Imunogenicidade.....	36
3.9	Monitorização da terapêutica	38
3.9.1	Quantificação dos níveis séricos de fármaco e de anticorpos antifármaco ..	38
3.9.2	Quantificação dos níveis de metaloproteinases.....	39
3.9.3	Outros parâmetros	41
II.	Objetivos	42
III.	Material e Métodos	43
1.	Seleção da amostra.....	43
2.	Parâmetros analisados	43
2.1	Parâmetros hematológicos.....	43
2.2	Parâmetros imunológicos.....	43
3.	Análise dos resultados	44
IV.	Resultados.....	45
1.	Caracterização da amostra	45
2.	Caracterização do perfil farmacoterapêutico	45
3.	Análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	47
3.1	Parâmetro clínico.....	47
3.2	Parâmetros hematológicos.....	48
3.3	Parâmetros imunológicos.....	50
4.	Análise dos perfis de evolução do tratamento	51

4.1	Perfil de evolução da atividade da doença	52
4.2	Perfil de evolução da velocidade de sedimentação	56
4.3	Perfil leucocitário	58
4.4	Perfil eritrocitário	60
4.5	Perfil plaquetário.....	61
5.	Análise de correlações entre parâmetros	62
5.1	Parâmetros hematológicos.....	62
5.2	Parâmetros imunológicos.....	66
V.	Discussão	69
VI.	Conclusões	76
VII.	Perspetivas Futuras	78
VIII.	Referências Bibliográficas	79

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da articulação sinovial do joelho, vista longitudinal (<i>Adaptado de “Human anatomy”, 2001⁴⁾</i>	2
Figura 2. Histologia de uma articulação sinovial normal (<i>Adaptado de “The musculoskeletal system - Basic Science and Clinical Conditions”⁵⁾</i>	3
Figura 3. Etapas para o desenvolvimento da AR (<i>Adaptado de McInnes & Schett., 2011³⁵⁾</i> . .	11
Figura 4. Genes associados com à suscetibilidade da AR e possível função na patogénese da doença (<i>Adaptado de “Rheumatoid Arthritis”¹³⁾</i>	12
Figura 5. Processos da imunidade inata e da imunidade adaptativa envolvidos na patogénese da AR (<i>Adaptado de McInnes & Schett., 2011³⁵⁾</i>	16
Figura 6. Tecidos articulares de doentes com AR (<i>Adaptado de Lee & Weinblatt, 2001¹¹⁰⁾</i> . .	19
Figura 7. Mecanismos subjacentes às complicações sistémicas observadas em doentes com AR (<i>Adaptado de McInnes & Schett, 2011³⁵⁾</i>	21
Figura 8. Papel do TNF- α na patogénese da AR (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	26
Figura 9. Modelo da estrutura molecular do IFX (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	28
Figura 10. Modelo da estrutura molecular do ETA (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	28
Figura 11. Modelo da estrutura molecular do ADA (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	29
Figura 12. Modelo da estrutura molecular do CZP (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	29
Figura 13. Modelo da estrutura molecular do GOL (<i>Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶⁾</i>	29
Figura 14. Vias inflamatórias ativadas pela IL-6 (<i>Adaptado de Dayer & Choy, 2010¹⁵⁹⁾</i>	30
Figura 15. Papel da IL-1 na patofisiologia da inflamação e da destruição articular na AR (<i>Adaptado de Furst, 2004¹⁶²⁾</i>	31
Figura 16. Alvo molecular do RTX (<i>Adaptado de Kukar et al., 2009¹⁶³⁾</i>	32
Figura 17. Alvo molecular do ABT (<i>Adaptado de Kukar et al., 2009¹⁶³⁾</i>	33
Figura 18. Mecanismos de autoimunidade e de imunogenicidade associados aos antagonistas do TNF- α (<i>Adaptado de Atzeni et al., 2012¹⁹⁰⁾</i>	36

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de Classificação da ACR/EULAR para a AR (<i>Adaptado de Sokolove et al., 2010</i> ²⁵).	7
Tabela 2. Citocinas envolvidas na patogénese da AR (<i>Adaptado de McInnes et al., 2011</i> ³⁵). ..	18
Tabela 3. Agentes biológicos no tratamento da AR (<i>Adaptado de Kuek et al, 2006</i> ¹³⁵).	24
Tabela 4. Características demográficas dos 25 doentes com AR envolvidos no estudo.	45
Tabela 5. Perfil farmacoterapêutico dos 25 doentes com AR envolvidos no estudo.	46
Tabela 6. Alterações à terapêutica biológica nos 11 doentes com AR.	47
Tabela 7. Valores médios de DAS28 e respetivos desvios padrão para o grupo de controlo e para o grupo de estudo.	47
Tabela 8. Valores médios dos parâmetros hematológicos e respetivos desvios padrão para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, analisados pelo teste <i>t</i> -Student e correspondentes valores de referência.	48
Tabela 9. Mediana, máximos e mínimos dos parâmetros hematológicos para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, analisados pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon e correspondentes valores de referência.	48
Tabela 10. Mediana, máximos e mínimos dos parâmetros imunológicos para o grupo de controlo e para o grupo de estudo e correspondentes valores de referência.	50
Tabela 11. Abordagem terapêutica dos doentes do grupo de estudo, com fármacos biológicos.	51
Tabela 12. Valores médios de VS e respetivos desvios padrão em cada intervalo de valores do DAS28 para o grupo de controlo e o grupo de estudo.	63
Tabela 13. Valores médios de hemoglobina e respetivos desvios padrão em cada intervalo de valores do DAS28 para os grupos de controlo e de estudo.	65

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Comparação dos valores médios e respetivos desvios padrão da contagem de leucócitos e neutrófilos no grupo de controlo e no grupo de estudo.	49
Gráfico 2. Comparação das medianas, máximos e mínimos dos valores de MCV no grupo de controlo e no grupo de estudo.	49
Gráfico 3. Perfil de evolução do DAS28 ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.	52
Gráfico 4. Perfil de evolução do DAS28 ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.	53
Gráfico 5. Perfil de evolução do DAS28 do doente B ao longo do tempo.	54
Gráfico 6. Perfil de evolução do DAS28 do doente C ao longo do tempo.	54
Gráfico 7. Perfil de evolução do DAS28 do doente D ao longo do tempo.	54
Gráfico 8. Perfil de evolução do DAS28 do doente E ao longo do tempo.	54
Gráfico 9. Perfil de evolução do DAS28 do doente F ao longo do tempo.	54
Gráfico 10. Perfil de evolução do DAS28 do doente G ao longo do tempo.	54
Gráfico 11. Perfil de evolução do DAS28 do doente H ao longo do tempo.	55
Gráfico 12. Perfil de evolução do DAS28 do doente I ao longo do tempo.	55
Gráfico 13. Perfil de evolução do DAS28 do doente J ao longo do tempo.	55
Gráfico 14. Perfil de evolução da VS ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo. .	56
Gráfico 15. Perfil de evolução da VS ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo. ...	57
Gráfico 16. Perfil de evolução do número de leucócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.	59
Gráfico 17. Perfil de evolução do número de leucócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.	59
Gráfico 18. Perfil de evolução do número de eritrócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.	60
Gráfico 19. Perfil de evolução do número de eritrócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.	60
Gráfico 20. Perfil de evolução do número de plaquetas ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.	61
Gráfico 21. Perfil de evolução do número de plaquetas ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.	61
Gráfico 22. Correlação entre o DAS28 e VS no grupo de controlo.	62
Gráfico 23. Correlação entre o DAS28 e VS no grupo de estudo.	62
Gráfico 24. Comparação dos valores médios de VS e respetivos desvios padrão para cada grupo definido pelos valores de DAS28 no grupo de controlo e no grupo de estudo.	64
Gráfico 25. Correlação entre o DAS28 e a hemoglobina no grupo de controlo.	64
Gráfico 26. Correlação entre o DAS28 e a hemoglobina no grupo de estudo.	64

Gráfico 27. Comparação dos valores médios de hemoglobina e respetivos desvios padrão para cada grupo definido pelos valores de DAS28 no grupo de controlo e no grupo de estudo.	65
Gráfico 28. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP no grupo de controlo.	66
Gráfico 29. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP no grupo de estudo.	66
Gráfico 30. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV no grupo de controlo.	66
Gráfico 31. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV no grupo de estudo.	66
Gráfico 32. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de FR IgA no grupo de controlo.	67
Gráfico 33. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de FR IgA no grupo de estudo.	67
Gráfico 34. Correlação entre o DAS28 e os índices anti-MCV/anti-CCP e FR IgA/anti-CCP no grupo de controlo.	68
Gráfico 35. Correlação entre o DAS28 e os índices anti-MCV/anti-CCP e FR IgA/anti-CCP no grupo de estudo.	68

Lista de Acrónimos

ABT	Abatacept
ACD	Anemia da doença crónica
aCL	Anticorpo anti-cardiolipina
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ACPA	Anticorpo anti-proteínas citrulinadas
ADA	Adalimumab
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
AKA	Anticorpo anti-queratina
ANA	Anticorpo antinuclear
Anti-β2-GP1	Anticorpo anti-β2-glicoproteína 1
Anti-CCP	Anticorpo anti-péptido cíclico citrulinado
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA em cadeia dupla
Anti-MCV	Anticorpo anti-vimentina mutada citrulinada
Anti-MPO	Anticorpo direcionado contra a mieloperoxidase
Anti-oxLDL	Anticorpo anti-LDL oxidada
Anti-PR3	Anticorpo direcionado contra a proteinase 3
APC	Células apresentadoras de antígenos
APF	Anticorpo anti- fator perinuclear
aPL	Anticorpos anti-fosfolípidos
AR	Artrite Reumatoide
ARA	Associação Americana de Reumatismo
AVC	Acidentes cardiovasculares
BCG	<i>Bacillus Camette-Guerin</i>
C3	Fator do complemento 3
C4	Fator do complemento 4
CA	Cartilagem articular
CCP	Péptido cíclico citrulinado
CDAI-ULS-G	Consultas de Doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
CRP	Proteína C reativa
CTLA4	Antígeno 4 associado ao linfócito T
CZP	Certolizumab Pegol
DAS28	<i>Disease Activity Score</i>
DC	Célula dendrítica

DMARDs	Fármacos antirreumáticos modificadores da evolução da doença
ETA	Etanercept
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FR	Fator reumatoide
G-CSF	Fator estimulante de colónias de granulócitos
GAG	Glicosaminoglicanos
GCs	Glucocorticoides
GLM	Golimumab
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos-monócitos
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HLA	Antigénio leucocitário humano
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
IFN	Interferão
IFX	Infliximab
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMIDs	Doenças inflamatórias imunomediadas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M-CSF	Fator estimulante de colónias de macrófagos
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MMP	Metaloproteinase da matriz
MTX	Metotrexato
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NOS	Espécies reativas de oxigénio
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAD	Deiminase peptidil-arginina
PEG	Polietileno glicol
PG	Proteoglicanos
PGE2	Prostaglandina E2
RDW	Índice de distribuição dos eritrócitos
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
SPR	Sociedade Portuguesa de Reumatologia
sTNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa solúvel
TACE	Enzima conversora do TNF- α

TB	Tuberculose
TCZ	Tocilizumab
Th	Células T auxiliares
TIMPs	Inibidores tecidulares de metaloproteinases
TLR	Recetor <i>toll-like</i>
tmTNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa transmembranar
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral beta
TNFR	Recetor do Fator de Necrose Tumoral
uPAR	Recetor ativador da plaminogénio-urocinase solúvel
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VS	Velocidade de sedimentação

I. Introdução

As doenças reumáticas constituem um grupo com mais de uma centena de patologias, com vários subtipos, que se podem definir como doenças e alterações funcionais do sistema músculo-esquelético de causa não traumática e incluem as doenças inflamatórias (do sistema músculo-esquelético, do tecido conjuntivo e dos vasos), as doenças degenerativas (das articulações periféricas e da coluna), as doenças metabólicas (ósseas e articulares), as alterações dos tecidos moles periarticulares e as doenças de outros órgãos e/ou sistemas relacionadas com as anteriores. Estas patologias podem ser agudas, recorrentes ou crónicas, atingem indivíduos de todas as idades, são causa frequente de incapacidade e, quando não diagnosticadas ou tratadas atempada e corretamente, podem ocasionar graves e desnecessárias repercussões físicas, psicológicas, familiares, sociais e económicas ¹.

As doenças inflamatórias reumáticas são geralmente patologias multifatoriais, e a complexidade dos processos patogénicos subjacentes a este tipo de doenças torna difícil o seu diagnóstico e respetivo tratamento ². Estas patologias são, nos países desenvolvidos, o grupo de doenças mais prevalente e constituem uma das principais causas de dor e incapacidade, tanto temporária como permanente ¹.

1. Sistema esquelético - Articulações Sinoviais

Uma das funções do sistema esquelético é permitir o movimento do corpo. O componente mais importante do movimento são as articulações. As articulações podem ser descritas como conexões existentes entre dois ou mais ossos e podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura ou de acordo com a sua função ³⁻⁴.

As articulações do corpo são agrupadas de acordo com a sua estrutura em três principais categorias: articulações fibrosas, articulações cartilagosas e articulações sinoviais. Nas articulações fibrosas, os ossos articulados são mantidos juntos por um tecido conjuntivo fibroso e não têm cavidades articulares. Nas articulações cartilagosas, os ossos articulados são mantidos juntos por cartilagem e também não apresentam cavidades articulares. Nas articulações sinoviais, os ossos articulados são limitados com cartilagem e os ligamentos, frequentemente, fornecem-lhes suporte. Essas articulações são distinguidas por apresentarem cavidades articulares preenchidas com líquido ³⁻⁴.

A classificação funcional das articulações é baseada no grau de movimento permitido dentro da articulação. Usando este tipo de classificação, os três tipos de articulações são sinartroses,

que são articulações imóveis, anfiartroses, que são articulações ligeiramente móveis e diartroses, que são articulações livremente móveis³⁻⁴.

Consensualmente, a classificação mais utilizada para denominar e descrever as articulações é a classificação estrutural. As articulações sinoviais são as mais complexas e variadas dos três principais tipos de articulações. A função das articulações sinoviais é proporcionar uma vasta gama de movimentos precisos e suaves, ao mesmo tempo que mantem a estabilidade, a força, e, em certos aspetos, a rigidez das articulações do corpo. Existem vários tipos de articulações sinoviais e classificam-se de acordo com as suas superfícies articulares³⁻⁴.

1.1. Anatomia

Como já foi referido, as articulações sinoviais são as articulações mais complexas e a sua estrutura é apresentada na figura 1.

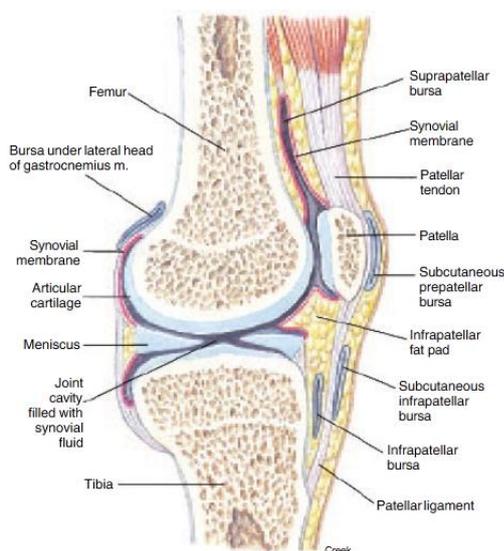


Figura 1. Estrutura da articulação sinovial do joelho, vista longitudinal (*Adaptado de "Human anatomy", 2001⁴*).

As superfícies articulares dos ossos com articulações sinoviais estão cobertas por uma fina camada de cartilagem hialina que se chama cartilagem articular e que constitui uma superfície lisa onde os ossos entram em contacto. Diversas articulações sinoviais têm ainda meniscos (discos articulares), que são estruturas fibrocartilagíneas que proporcionam força e resistência adicionais à articulação e aumentam a profundidade da cavidade articular³⁻⁴.

As superfícies articulares dos ossos que se encontram numa articulação sinovial estão encerradas numa cavidade articular, rodeada por uma cápsula articular que ajuda a manter os ossos unidos, ao mesmo tempo que permite o movimento³⁻⁴.

A cápsula articular é constituída por duas camadas, uma cápsula fibrosa exterior e uma membrana sinovial interior. A cápsula fibrosa é constituída por tecido conjuntivo denso e heterogéneo e está na continuidade da camada fibrosa do perióstio que cobre os ossos que

constituem a articulação. Há porções da cápsula fibrosa que podem espessar-se, de modo a formar filamentos. Pode haver também no exterior desta cápsula ligamentos e tendões que contribuem para fortalecer e estabilizar a articulação, ao mesmo tempo que limitam o movimento em algumas direções³⁻⁴.

A membrana sinovial reveste a cavidade articular, exceto a cartilagem articular. É uma membrana fina e delicada que consiste num conjunto de células de tecido conjuntivo modificado, intercaladas em partes da cápsula fibrosa ou separadas dela por uma camada de tecido areolar ou adiposo. A membrana produz líquido sinovial que consiste num filtrado do soro sanguíneo e secreções das células sinoviais³⁻⁴.

1.2. Histologia

A membrana sinovial tem uma camada de revestimento que consiste em células especiais denominadas sinoviócitos e normalmente forma uma camada com uma espessura de uma a três células, como é esquematicamente ilustrado na figura 2.

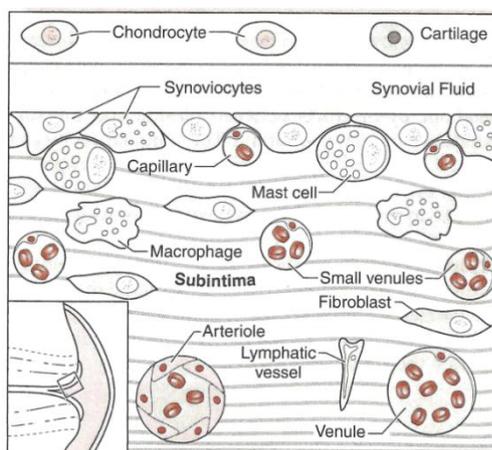


Figura 2. Histologia de uma articulação sinovial normal (*Adaptado de “The musculoskeletal system - Basic Science and Clinical Conditions”*⁵).

Não existe uma membrana basal que separa a camada de sinoviócitos da camada subintima. Existem pelo menos dois tipos diferentes destas células, o tipo A e o tipo B. As células do tipo A derivam da linhagem de macrófagos da medula óssea e as células do tipo B são células mesenquimais semelhantes a fibroblastos e são por isso denominadas, respetivamente, como sinoviócitos tipo-macrófago e sinoviócitos tipo-fibroblasto. Outros tipos de células nesta camada incluem as células dendríticas (DCs). Os sinoviócitos encontram-se no estroma, composto de fibrilas de colagénio e proteoglicanos (PG), que é contínuo com a camada subintima. Esta última pode ser fibrosa, constituída por gordura⁵.

As articulações sinoviais contêm uma rede densa de capilares fenestrados, que facilitam a troca de moléculas entre a circulação e a membrana sinovial. Os vasos são derivados de ramos do plexo arterial que fornece a cápsula articular e as articulações ósseas. Existe ainda um

fornecimento linfático, que é um sistema vascular envolvido na remoção de grandes moléculas a partir da membrana sinovial ⁵.

1.3. Fisiologia

O líquido sinovial é uma mistura complexa de polissacáridos, proteínas, lípidos e células. O principal polissacárido é o ácido hialurônico, que contribui em grande parte para a consistência viscosa e para as qualidades lubrificantes do líquido sinovial. Este líquido forma uma importante camada fina lubrificante que cobre as superfícies das articulações ³⁻⁴.

Em certas articulações sinoviais, a membrana sinovial pode estender-se como uma bolsa ou saco denominado bolsa sinovial, afastando-se do resto da cavidade articular. As bolsas contêm líquido sinovial e constituem almofadas cheias de líquido entre estruturas que, de outro modo, ao movimentarem-se umas sobre as outras, como tendões a deslizar sobre ossos ou sobre outros tendões, provocariam atrito e dor ³⁻⁴.

Na margem periférica da cavidade articular, os vasos sanguíneos formam uma rede vascular que nutre a cartilagem, mas os vasos sanguíneos não penetram na cartilagem nem entram na cavidade articular. A cartilagem articular recebe ainda nutrientes a partir do osso esponjoso subjacente e do líquido sinovial que a recobre. Os nervos sensitivos entram na cápsula fibrosa e, em menor extensão, na membrana sinovial. Estes nervos não se limitam apenas a transmitir ao encéfalo informação sobre a dor articular, mas fornecem também informação permanente sobre a posição e o grau de movimento articular. Os nervos não entram nem na cartilagem, nem na cavidade articular ³⁻⁴.

1.4. Composição da matriz extracelular articular

A cartilagem articular (CA) é do tipo hialino, revelando à observação macroscópica uma superfície lisa, deslizante e esbranquiçada variável em transparência e topograficamente, sendo desprovida de vasos sanguíneos e linfáticos, bem como de nervos. Este componente altamente especializado das articulações sinoviais apresenta um elevado nível de organização celular, complementado por uma matriz consideravelmente estruturada de forma similar, o que permite cumprir as suas funções eficazmente ⁶.

A CA é constituída pelos condrócitos, que ocupam cerca de 1% a 10% do peso hidratado, e a matriz extracelular envolvente, de aspeto homogéneo e translúcido, formada essencialmente por duas fases: a matriz orgânica sólida, por sua vez composta por três classes principais de constituintes colagénio, PG e glicosaminoglicanos (GAG), e proteínas não colagénias (glicoproteínas); e uma fase fluida intersticial móvel que corresponde maioritariamente à água. O conteúdo em água é bastante elevado, variando entre 60% a 80% do peso total, e é

geralmente superior junto à superfície articular. O material sólido corresponde a cerca de 20% a 30% do peso hidratado ⁶.

O colagénio constitui 50 a 60% do peso seco da cartilagem (15 a 22% do peso hidratado) e, conseqüentemente, é a macromolécula mais abundante na CA ⁷. O seu conteúdo não é uniforme, sendo substancialmente mais elevado nas camadas superficiais (80%), decrescendo até à zona profunda (65%). O colagénio do tipo II, sendo o colagénio específico do tecido cartilágneo, é o mais abundante, correspondendo a 75% do colagénio total na cartilagem fetal e a mais de 90% no adulto ⁸⁻¹⁰. Encontra-se na CA sob a forma de finas fibrilas dispersas pela substância fundamental, formando uma rede que serve como um esqueleto organizador, auxiliando a manutenção da integridade estrutural da CA. As fibras de colagénio resistem sobretudo às forças de tensão, que se exercem paralelamente à superfície cartilágnea, graças à sua notável resistência tênsil ⁶.

Os PG da CA correspondem a cerca de 4 a 7% do peso hidratado e pertencem a uma família de moléculas com grande variabilidade em tamanho e composição. Os PG da matriz cartilágnea dividem-se em dois tipos principais: grandes PG não agregados (10 a 40%) e grandes PG agregados (50 a 85%), assumindo níveis de organização distintos ¹⁰. Os primeiros sob a forma de sub-unidades e os segundos associando-se ao ácido hialurónico (AH), o qual cumpre um papel chave a nível bioquímico e fisiológico ¹¹.

2. Artrite Reumatoide

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória crónica sistémica, de etiologia desconhecida e está associada com incapacidade progressiva, complicações sistémicas, morte prematura e elevados custos socioeconómicos ¹².

Esta patologia caracteriza-se por edema da membrana sinovial, danos na cartilagem e no osso em torno das articulações, levando a destruição da articulação e apresenta também características sistémicas, incluindo distúrbios cardiovasculares, pulmonares, psicológicos e esqueléticos ¹³. As articulações vulgarmente afetadas são as articulações interfalângicas proximais, as articulações metacarpofalângicas, as articulações dos punhos, cotovelos, da coluna cervical e articulações dos pés, joelhos e tornozelos ¹⁴.

A gravidade da doença, a evolução clínica e respostas individuais ao tratamento são muito variáveis. Os sintomas na AR podem desenvolver-se em dias ou evoluir ao longo de muitas semanas ou meses ¹⁵. Vários padrões distintos de doença articular são reconhecidos, incluindo predominantemente artropatia pequena ou média, predominantemente artropatia grande, *flitting* ou ataques transitórios de dor nas articulações (reumatismo palíndromo) e dor e rigidez das cinturas pélvica e do ombro (polimialgia). A dor e a incapacidade na AR precoce estão relacionadas com a gravidade da doença e medidas de sofrimento psicológico ¹⁶.

A progressão da doença pode ser muito rápida ou pontuada por remissões parciais ou completas de intervalos variáveis e imprevisíveis ¹⁴.

2.1. Epidemiologia

A AR apresenta uma prevalência entre 0,5% e 1% da população, com três vezes mais prevalência nas mulheres do que nos homens e desenvolve-se entre os 40 anos e 70 anos. A prevalência da doença aos 65 anos de idade é seis vezes maior que aos 25 anos de idade. Estimativas da Inglaterra e País de Gales mostram uma incidência anual de 31 por 100.000 mulheres e 13 por 100.000 homens, sugerindo um declínio nas últimas décadas, e uma prevalência de 1,2% em mulheres e 0,4% nos homens ¹⁷.

A prevalência de AR em Portugal foi estimada entre 0,5 e 1% em 2001 e a incidência varia entre 2 a 4 casos por 10.000 pessoas em cada ano ^{1,18}.

2.2. Diagnóstico

O diagnóstico da AR é muitas vezes difícil, devido a um amplo espectro de apresentações, mudanças progressivas no curso da doença ao longo do tempo, e, talvez mais importante, a ausência de um *gold standard* ou de parâmetros laboratoriais clínicos para definir a patologia. Várias tentativas de criação de critérios de classificação da AR têm sido realizadas, no entanto, houve limitações significativas na aplicação desses critérios para a definição clínica da patologia ¹⁹.

Os critérios de classificação para a AR foram propostos pela primeira vez em 1956, e, foram aprovados e publicados pela Associação Americana de Reumatismo (ARA) em 1958 ²⁰⁻²¹. Como os critérios de 1958 incluíam uma série de características histológicas que não eram aplicáveis na prática clínica, este domínio foi posteriormente excluído, tornando, assim, os critérios mais aplicáveis para uso em estudos epidemiológicos. Enquanto os critérios de 1958 separavam os doentes em AR possível, AR provável, AR definitiva, e AR clássica, a revisão, conhecida como os Critérios de Nova York, efetuada em 1967, foi pouco aceite devido à ausência de um *cut-point* definido para o diagnóstico definitivo de AR ²²⁻²³.

O próximo conjunto de critérios foi inicialmente criado por uma comissão da ARA, agora conhecida como Colégio Americano de Reumatologia (ACR), e desenvolvido por um grupo de líderes no campo de doenças reumáticas, em 1987 ²⁴. No entanto, tornou-se imediatamente evidente que estes critérios apresentavam limitações significativas em relação à sensibilidade e especificidade do diagnóstico ¹⁹.

Então, em 2010, a ACR e a Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR - *European League Against Rheumatism*) propuseram uma nova abordagem de classificação da AR, reforçando a importância do diagnóstico precoce para permitir uma intervenção terapêutica atempada e

prevenir ou minimizar a ocorrência de complicações¹⁹. Deste modo, quatro critérios adicionais foram identificados como essenciais para a classificação da doença: tipo e número de articulações afetadas, marcadores serológicos como o fator reumatoide (FR) e anticorpos anti-péptido citrulinado cíclico (anti-CCP), marcadores da resposta de fase aguda como a velocidade de sedimentação (VS) e proteína C reativa (CRP) e duração dos sintomas^{19,25-26}.

Deste modo, este novo sistema de classificação dos critérios ACR/EULAR, similar aos critérios anteriores, inclui quatro domínios, a duração dos sintomas, o número e o tipo de articulações envolvidas e biomarcadores laboratoriais de inflamação e autoimunidade²⁵⁻²⁶. A classificação da AR da ACR/EULAR é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios de Classificação da ACR/EULAR para a AR (*Adaptado de Sokolove et al., 2010²⁵*).

Joint Involvement	Serology	Duration	Acute Phase Reactants
1 Large joint (0 points)	Negative RF and CCP (0 points)	Less than 6 weeks (0 points)	Abnormal ESR or CRP (1 point)
2-10 Large joints (1 point)	Low titer positive CCP or RF (2 points)	6 or more weeks (1 point)	
1-3 small joints (2 points)	High titer CCP or RF (3 points)		
4-10 small joints (3 points)			
More than 10 joints (with at least one small joint) (5 points)			
Total Possible Points			
5	3	1	1

Patients receive the highest point level for each domain: 6 points is defined as definite RA, though those with lower scores may obtain more points with time and subsequently be defined as having RA.

Embora os novos critérios possam ser adequados para o diagnóstico da AR estabelecida, estes foram desenvolvidos para o diagnóstico precoce da doença, antes da imagiologia comum poder revelar sinovite, erosões nas articulações e outras alterações radiológicas típicas da doença²⁶.

O ACR desenvolveu também um instrumento de avaliação objetiva da atividade da AR, o *Disease Activity Score (DAS28)*, baseado no número de articulações afetadas (num total de 28), no valor da VS (ou CRP) e no grau de comprometimento causado pela doença²⁷⁻²⁸. Os critérios da EULAR definem a atividade da doença através do cálculo do DAS28. Assim:

- DAS28 < 2,6 - remissão da doença;
- 2,6 < DAS28 < 3,2 - atividade baixa da doença;
- 3,2 < DAS28 < 5,1 - atividade moderada da doença;
- DAS28 > 5,1 - atividade elevada da doença.

Em 1978, James Fries e os seus colaboradores desenvolveram o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), que avalia a incapacidade física com base em 20 questões sobre as atividades básicas da vida diária do doente²⁹⁻³¹.

2.2.1 Características clínicas

Como já foi referido, o diagnóstico diferencial da AR requer diferentes tipos de avaliações, seja a realização de questionários ao doente ou a realização de testes com relevância científica, como testes laboratoriais ou exames radiológicos. O conhecimento do historial clínico e a avaliação física e psicológica do doente são importantes parâmetros para o diagnóstico e a monitorização da AR³².

Ao nível dos testes científicos e laboratoriais revela-se importante a realização de radiografias, a pesquisa de marcadores e auto-anticorpos³²⁻³³.

As alterações a nível do hemograma são variáveis. No entanto, a contagem de plaquetas está geralmente aumentada e a contagem de leucócitos pode também estar³⁴.

A AR é uma doença que se caracteriza por manifestações extra-articulares, consequência da inflamação sistémica que ocorre nesta patologia³⁵. Entre estas manifestações sistémicas, salienta-se a anemia. No geral, a anemia na AR é classificada como anemia de doença crónica (ACD) e é uma anemia normocítica e normocrómica^{34,36}. A ACD é considerada a causa mais frequente de anemia na AR, no entanto, alguns doentes desenvolvem anemia por deficiência de ferro, ou seja, anemia microcítica^{34,36}. Em vários estudos transversais, a prevalência de ACD em doentes com AR foi estimada entre 30% e 70%³⁶⁻⁴¹.

Geralmente, a anemia desenvolve-se lentamente, durante o primeiro mês de doença e observou-se uma associação entre esta e um maior grau de atividade da doença^{36,39}. A ACD caracteriza-se pela diminuição do ferro plasmático, diminuição da capacidade de ligação de ferro total, diminuição da saturação da transferrina, diminuição dos sideroblastos na medula óssea e níveis de ferro reticuloendoteliais normais ou aumentados⁴².

A ACD é conduzida imunologicamente, isto é, as citocinas e as células do sistema reticuloendotelial induzem alterações na homeostase do ferro, na proliferação de células progenitoras eritroides, na produção de eritropoietina, e no tempo de vida dos eritrócitos, o que contribui para a patogénese da anemia⁴³.

Na pesquisa de marcadores inflamatórios torna-se relevante a avaliação da VS e da CRP para monitorizar a progressão da doença. Estes biomarcadores encontram-se geralmente aumentados³³⁻³⁴. No entanto, estes marcadores de inflamação apresentam sérias limitações no que diz respeito ao diagnóstico da AR, em primeiro lugar porque são marcadores genéricos da inflamação. Além disso, vários estudos revelaram que cerca de 40 % dos doentes com AR, apresentam valores normais de VS e CRP⁴⁴⁻⁴⁵. Uma limitação adicional é que, enquanto uma

diminuição da VS e CRP é vista com melhoria clínica em grupos de doentes, estes parâmetros tendem a ser estáveis em muitos doentes, mesmo com melhoria clínica ⁴⁶.

Também a avaliação da função renal e hepática deve ser efetuada na monitorização da AR, nomeadamente para a prescrição de um tratamento ³²⁻³³.

2.2.2 Auto-anticorpos

Nos testes laboratoriais na AR é característica a positividade de alguns auto-anticorpos.

O primeiro anticorpo associado à AR foi o FR, descoberto em 1940 por Waaler ⁴⁷. Os FRs são uma família de auto-anticorpos dirigidos contra a porção Fc da IgG e são produzidos localmente na AR pelas células B presentes em folículos linfoides e em estruturas do centro germinal, que se desenvolvem na membrana sinovial inflamada ⁴⁸⁻⁴⁹. O FR IgM é o anticorpo mais importante do FR na doença e são detetadas em 60 a 80% dos doentes ⁵⁰. No entanto, o FR tem sido observado em outras doenças autoimunes, tais como, lúpus eritematoso sistémico, doença mista do tecido conjuntivo e síndrome de Sjögren primário, bem como em condições não autoimunes, tais como em infeções crónicas e no envelhecimento, o que leva a que a especificidade deste teste seja relativamente baixa ⁵⁰⁻⁵¹.

Em 1964, Nienhuis e Mandema descreveram um auto-anticorpo, específico da AR, que denominaram como anticorpo anti-fator perinuclear (APF). Estes anticorpos reagem com grânulos de querato-hialina, dispersos em torno da região perinuclear das células epiteliais da mucosa bucal ⁵². Os anticorpos APF estavam presentes até 90% dos doentes com AR estabelecida, com uma especificidade de 73 a 99% ⁵³. Em 1979, Young e os seus colaboradores descreveram outro auto-anticorpo, específico da AR, anticorpo anti-queratina (AKA). Estes anticorpos foram detetados em crio-seções de esófago de rato ⁵⁴. A sensibilidade do ensaio em doentes com AR era de 36 a 59% e a especificidade de 88 a 99% ⁵³. Apesar da alta especificidade destes auto-anticorpos para a AR, estes testes não foram amplamente utilizados pela dificuldade de padronização ⁵⁵.

Em 1995, Sebbag e os seus colegas demonstraram que ambos os anticorpos acima descritos pertencem a uma família de auto-anticorpos dirigidos contra a filagrina citrulinada, uma proteína de células epiteliais ⁵⁶. Estes anticorpos foram denominados como anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA). Embora a filagrina não esteja presente na membrana sinovial, várias proteínas citrulinadas, incluindo o fibrinogénio e a fibronectina, estão presentes nesta estrutura e outros epítomos citrulinados foram identificadas como alvos de anticorpos ⁵⁷⁻⁶⁰.

Os ACPA podem reconhecer o aminoácido não clássico citrulina, incorporado na estrutura de uma proteína ^{59,61}. A citrulina é um aminoácido não-codificado, gerado por uma modificação pós-tradução de proteínas, mediada pela enzima deiminase peptidil-arginina (PAD) ⁶². Este processo ocorre naturalmente durante uma variedade de processos biológicos, incluindo a

inflamação e a apoptose ⁶³. Os ACPAs são encontrados em 70 a 90% dos doentes com AR e têm uma especificidade elevada para a doença (90 a 95%) ⁶⁴⁻⁶⁵.

A descoberta de uma reação de citrulinização de origem imunológica, específica na AR, deu uma contribuição substancial na abordagem do diagnóstico desta patologia.

Em 1998, Schellekens e colaboradores produziram péptidos sintéticos citrulinados lineares, derivados de filagrina humana, facilmente detetados por ELISA com maior sensibilidade e sem perda de especificidade ⁵⁹. Para melhorar a composição dos antígenos e o reconhecimento do anticorpo, foi desenvolvido um péptido citrulinado cíclico ⁶⁴. Devido ao facto deste ensaio usar um péptido citrulinado cíclico, derivado da filagrina (como antígeno), o anticorpo específico tornou-se conhecido como o anticorpo anti-CCP ⁶⁶. Os anticorpos anti-CCP são encontrados em 60 a 88% dos doentes com AR, dependendo das características da população, e este teste apresenta uma especificidade muito elevada, cerca de 96 a 99% ^{64,67-68}. Vários estudos têm demonstrado que os anticorpos anti-CCP não são apenas altamente específicos, mas também têm alto valor preditivo para a progressão erosiva da doença e apresentam, portanto, valor de prognóstico ⁶⁹.

Existe outra classe de ACPA, os anticorpos anti-SA e foram inicialmente identificados como auto-anticorpos que reconheciam uma proteína de 50 kDa no baço humano e em extratos de placenta, denominada como antígeno SA. O alvo destes anticorpos foi mais tarde identificado como sendo a vimentina citrulinada ⁷⁰. Os anticorpos anti-SA são detetados em 31 a 43% dos doentes com AR, com uma especificidade muito elevada (> 98%) ⁷¹⁻⁷³. Além disso, os anticorpos anti-SA têm alto valor preditivo para a AR, cerca de 84 a 99%, e estão intimamente associados a manifestações extra-articulares e ao comprometimento articular grave ⁷⁰.

Na sequência da observação que ocorre uma reação de citrulinização na AR, foram efetuados estudos no sentido de identificar novos alvos antigénicos, à semelhança do que ocorreu com os anticorpos anti-CCP. Assim, foi desenvolvido um neo-antígeno, a partir da mutação da vimentina citrulinada, a vimentina mutada citrulinada. Vários estudos demonstraram que tanto a citrulinização como a mutação podem ter influência na antigenicidade da vimentina. Estudos demonstraram que os anticorpos anti-vimentina mutada citrulina (anti-MCV) têm uma especificidade semelhante à dos anticorpos anti-CCP, e uma sensibilidade de 82%. Existem dados que suportam que os anticorpos anti-MCV são importantes para o diagnóstico e prognóstico das erosões articulares na AR ⁷⁴⁻⁷⁵.

Em contraste com a maioria das outras doenças autoimunes sistémicas, os antígenos nucleares não formam estruturas alvo comuns na AR. Assim, a incidência de anticorpos anti-nucleares (ANA), detetada por imunofluorescência indireta, é apenas 20 a 30%, e os anticorpos são geralmente dirigidos contra antígenos que também são específicas de outras doenças, e, portanto, são de pouca ou nenhuma relevância para fins de diagnóstico.

2.3. Etiologia

Como já foi referido, a origem da AR permanece desconhecida. No entanto, existem fatores de risco para a AR e estes compreendem uma combinação de fatores genéticos, ambientais, e estatísticos. As contribuições relativas de fatores genéticos podem ser estimadas para a AR, no entanto, é mais difícil separar as contribuições dos fatores estocásticos e ambientais ^{13,76}. As contribuições genéticas e ambientais são mostradas na figura 3.

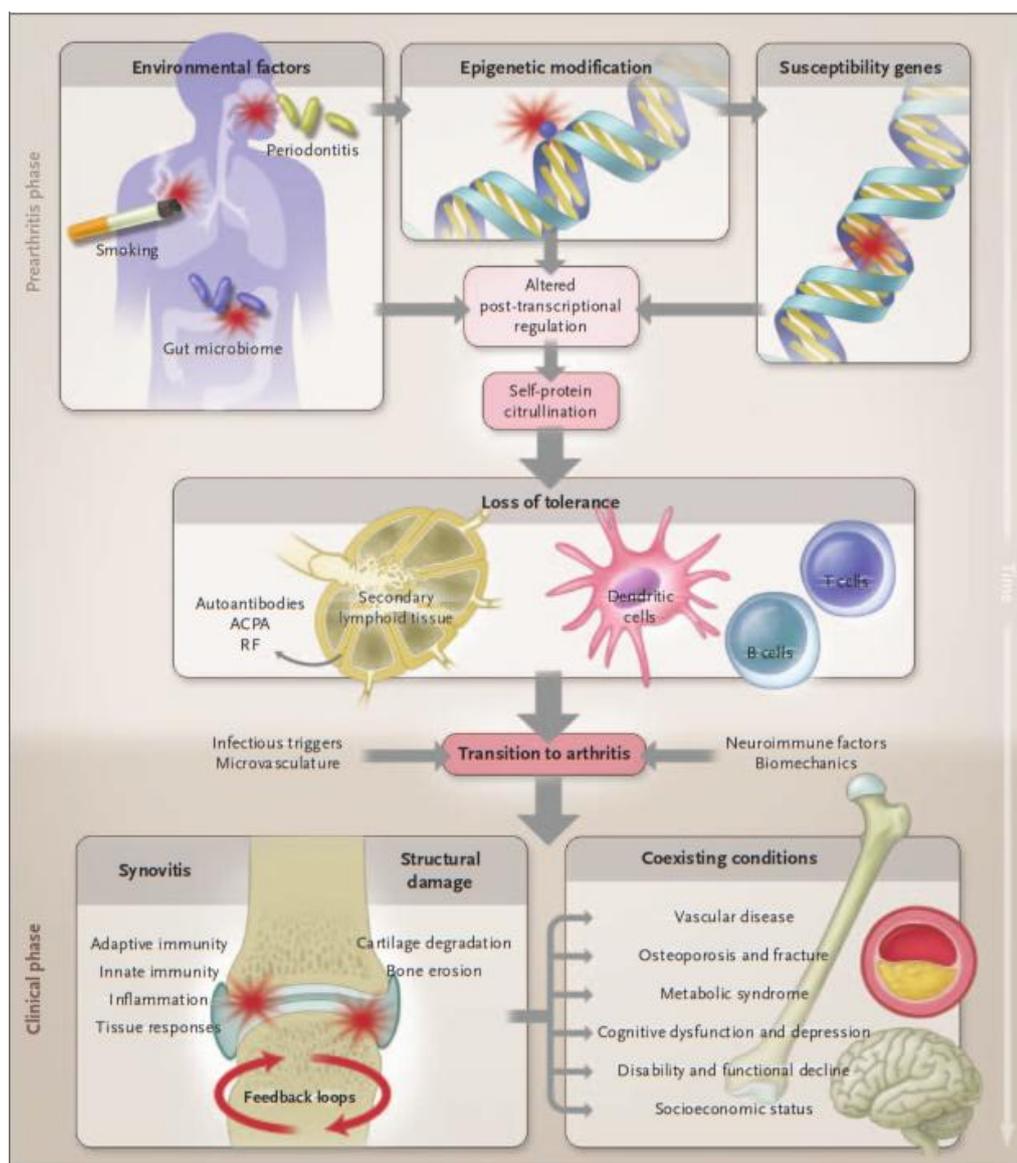


Figura 3. Etapas para o desenvolvimento da AR (Adaptado de McInnes & Schett., 2011 ³⁵).

As interações gene-ambiente promovem a perda de tolerância a proteínas do próprio que contêm um resíduo de citrulina, o qual é gerado por modificação pós-tradução. Esta resposta anti-citrulina pode ser detetada em células T e em células B e é provavelmente iniciada em tecidos linfoides secundários ou na medula óssea. Depois disso, a localização da resposta inflamatória ocorre na articulação em virtude de mecanismos pouco conhecidos, que provavelmente envolvem mecanismos microvasculares, neurológicos, biomecânicos, ou outros. A sinovite é iniciada e perpetuada por ciclos de *feedback* positivo e, por sua vez promove alterações sistêmicas que constituem o síndrome da AR.

Vários genes e fatores ambientais, como o tabagismo, infecções e fatores hormonais, têm sido implicados na suscetibilidade e na progressão desta patologia ¹³.

A interação entre dois ou mais fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, poderá potencialmente desencadear a AR. Estas possíveis interações, através de diferentes mecanismos, provavelmente resultam na perda de tolerância a neoepítomos e, como consequência, desenvolve-se uma resposta imunitária contra antigénios das articulações sinoviais, resultando em danos nestas estruturas ³⁵.

2.3.1 Fatores genéticos

A influência genética na AR está estimada em cerca de 50-60% ⁷⁷ e alguns dos genes associados à suscetibilidade desta patologia são apresentados na Figura 4.

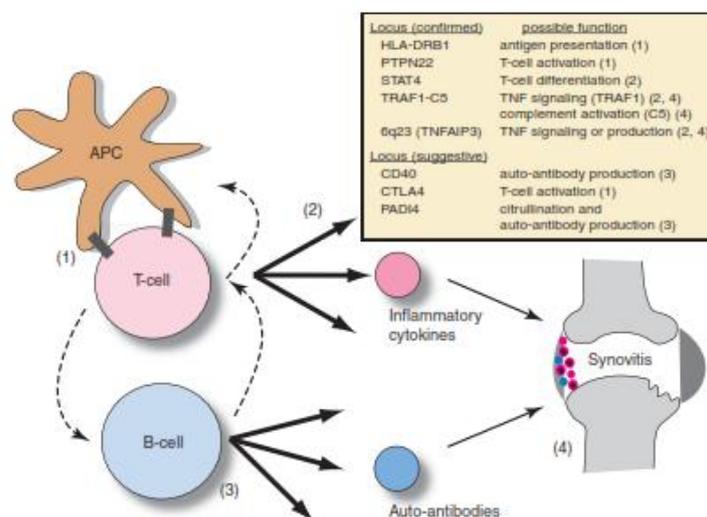


Figura 4. Genes associados com à suscetibilidade da AR e possível função na patogénese da doença (Adaptado de “Rheumatoid Arthritis” ¹³).

Estudos com gémeos têm envolvido fatores genéticos na AR, com taxas de concordância de 15 a 30% entre gémeos monozigóticos e 5% entre os gémeos dizigóticos ⁷⁷. A análise da hereditariedade destes estudos sugere que cerca de 60% da predisposição de uma população para desenvolver AR pode ser explicada por fatores genéticos, embora na análise de pares de gémeos concordantes para a patologia, tenha sido observada uma variabilidade grande na severidade da doença ⁷⁷⁻⁷⁸.

Análises do genoma elucidaram que existem fatores imunes regulatórios subjacentes à doença ⁷⁹. A associação de longa data com o lócus do antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1 e DR4 tem sido confirmada em doentes que são positivos para o FR ou ACPA; alelos que contêm um motivo comum de aminoácido (QKRAA) na região HLA-DRB1, denominado epítomo partilhado, conferem uma suscetibilidade particular ^{13,80}. Têm sido descritos outros genes com implicações na suscetibilidade da AR ^{13,35}.

2.3.2 Fatores ambientais

A "influência ambiental" é uma noção ambígua, que engloba exposições físicas a partir de distintos agentes ambientais e associações com determinados estilos de vida, bem como associações com diferentes condições socioeconômicas. Além disso, fatores como medicamentos, incluindo hormonas, podem também ser considerados neste grupo¹³.

O tabagismo é hoje o fator de risco ambiental mais bem estabelecido para a AR, mas a relação não foi evidente até 1987, quando o risco aumentado de AR em fumadores foi observado por acaso num estudo⁸¹. Desde então um grande número de estudos epidemiológicos tem confirmado o aumento do risco para a AR, em fumadores⁸²⁻⁸⁵.

A possibilidade de que as infeções podem desencadear o desenvolvimento da AR tem suscitado muito interesse, mas existe pouca evidência sólida de que diferentes microrganismos possam causar ou contribuir para a patologia. Os potenciais de agentes infecciosos que poderão estar envolvidos na patogénese são conhecidos, no entanto existem várias limitações para detetar estas contribuições⁸⁶⁻⁸⁷. Uma possibilidade é que as infeções podem contribuir para AR através das suas ações adjuvantes, semelhante à artrite adjuvante em roedores⁸⁸⁻⁸⁹. Além disso, a aplicação de micobactérias como adjuvantes no tratamento de tumores ou como vacinas conduziu, em alguns casos, ao desenvolvimento de artrite, facto que fornece algum apoio, ainda que indireto a esta teoria⁹⁰⁻⁹¹. Outros autores propõem que um agente infeccioso pode desencadear a AR através de um mecanismo de mimetismo molecular⁹²⁻⁹³. Ainda assim, a possibilidade de que agentes microbianos possam desencadear a AR definitivamente existe, como no caso de artrite de Lyme, onde se demonstrou que a transmissão de *Borrelia* através de artrópodes desencadeou esta patologia⁹⁴⁻⁹⁵.

Têm sido descritos outros fatores ambientais, como a alimentação, o café, o álcool e a exposição a determinadas substâncias, que podem contribuir tanto para início da AR, como para a sua progressão^{13,96}.

2.4. Tratamento

O tratamento da AR pressupõe uma abordagem multidisciplinar, preferencialmente sob orientação de um Reumatologista. As medidas adotadas para o seu tratamento visam prevenir e controlar a lesão articular, prevenir a perda de função, diminuir os sintomas da doença e também controlar a progressão desta. O tratamento desta patologia envolve medidas farmacológicas, não farmacológicas e cirúrgicas⁹⁷⁻⁹⁹.

Sendo a AR uma doença fortemente debilitante, quer do ponto de vista físico, mas também pelas complicações psicológicas que dela advêm, as medidas não farmacológicas, como a educação do doente, fisioterapia, terapia ocupacional e psicoterapia, assumem um papel central e crucial para o restabelecimento da qualidade de vida do doente⁹⁸⁻¹⁰⁰.

O tratamento farmacológico da AR pode ser efetuado em monoterapia ou em combinação e inclui o uso de anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), glucocorticoides (GCs) e fármacos antirreumáticos modificadores da evolução da doença (DMARDs) ^{13,98-99}.

Os AINEs são amplamente utilizados em todas as doenças reumáticas inflamatórias e não-inflamatórias, incluindo a AR. O objetivo do tratamento é reduzir a dor e a rigidez e melhorar a função, contribuindo assim para um aumento da qualidade de vida dos doentes. Estes fármacos não modificam o processo da doença e várias recomendações têm sido feitas no sentido de minimizar o uso destes fármacos devido à sua toxicidade ^{98,101}.

Os GCs desempenham um papel central na gestão da AR. Entre 25 e 75% dos doentes com AR são tratados mais ou menos continuamente com estes fármacos. Estudos têm restabelecido o potencial de modificação da doença de baixas doses de GCs na AR e relançaram o debate sobre as relações risco/ benefício deste tratamento. Para a prática diária, algumas recomendações são dadas pela EULAR sobre a gestão da terapia sistémica de GCs em doenças reumáticas ^{98,102-104}.

A aplicação de DMARDs constitui a base de tratamento da AR. A aplicação destes fármacos sofreu grandes alterações na última década, que proporcionaram uma terapêutica mais eficaz desta patologia. Estes fármacos interferem diretamente com as células do sistema imunitário ou reduzem a inflamação, têm a capacidade de aliviar os sintomas da AR e são potencialmente capazes de retardar ou parar a progressão da doença. Os DMARDs são geralmente classificados em dois grupos: fármacos convencionais ou sintéticos e fármacos biológicos ^{97,105-107}.

Dentro dos DMARDs clássicos, o metotrexato (MTX) constitui a base de tratamento da AR, representando a escolha farmacológica de primeira linha, de acordo com as recomendações da EULAR. Estas recomendações baseiam-se na elevada eficácia do fármaco, melhores resultados a longo prazo e menor custo associado quando em comparação com a terapêutica biológica ⁹⁹.

Como alternativa em caso de falência da terapêutica convencional, contraindicação ou resposta insuficiente aos fármacos tradicionais, surge a terapêutica biológica (DMARDs biológicos). Estes fármacos permitem direcionar a terapêutica para alvos específicos do sistema imunitário, envolvidos na inflamação e nos danos nas articulações ⁹⁹. A terapêutica biológica será abordada no capítulo 3.

2.5. Fisiopatologia

A AR é uma doença inflamatória crónica, sistémica e autoimune. A sua patogénese é complexa e envolve mecanismos de autoimunidade e de inflamação, mediados por células do sistema imunitário e células mesenquimais, como fibroblastos sinoviais, osteoclastos e condrócitos ¹⁰⁸.

Embora a patogênese da AR permaneça parcialmente incompreendida, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos têm vindo a ser elucidados nas últimas décadas, como resultado de trabalhos de investigação exaustivos.

Existem várias hipóteses que descrevem o início do processo patológico, inerente à AR. Alguns autores defendem que o primeiro evento que conduz à inflamação sinovial é a ativação do sistema imunitário inato, através da exposição a antígenos endógenos ou exógenos, como PG e DNA bacteriano, cuja presença na membrana sinovial foi confirmada. Outros autores defendem que a ativação do sistema imunitário inato inicia o processo patológico e esta é a hipótese universalmente mais aceite. Esta teoria pressupõe que a produção de auto-anticorpos, como o FR ou anticorpos anti-CCP, através de interações do sistema imunitário inato, células apresentadoras de antígenos (APCs), com o sistema imunitário adaptativo, células T auxiliares (Th) CD4⁺ e células B, é central para a patogênese da doença. Isto ocorre como consequência da perda de tolerância de células T, sob a influência genética dos alelos HLA-DR, e resultante autoreatividade a antígenos articulares ¹².

Vários antígenos têm sido descritos como alvos de auto-anticorpos na AR. Colagénio tipo II, PG, agregano (PG específico da cartilagem), proteína de ligação à cartilagem, proteínas de choque térmico e muitos antígenos específicos das articulações, têm sido implicados em virtude da reatividade dos linfócitos T e anticorpos na AR ¹².

Aparte destas questões e embora o fator específico que desencadeia a resposta autoimune na AR não seja conhecido, todo o processo ocorre de forma cíclica, com mecanismos dependentes uns dos outros e que potenciam todo o processo inflamatório autoimune. A patogênese da AR é simbolicamente apresentada na figura 5.

A membrana sinovial de doentes com AR é caracterizada por hiperplasia, aumento da vascularidade e infiltração pronunciada de células inflamatórias, incluindo linfócitos T CD4⁺, linfócitos B, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos ^{35,109}.

Os linfócitos T CD4⁺, ativados por antígenos, estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzir as citocinas interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e segregam metaloproteinases da matriz (MMP), através de interações de moléculas da superfície celular ou por meio da libertação de mediadores solúveis, tais como o interferão (IFN) e IL-17. A IL-1, IL-6 e o TNF- α são citocinas chave que conduzem à inflamação na AR. Estes macrófagos, linfócitos e fibroblastos, bem como os seus produtos de ativação, podem também estimular a angiogénese, o que explica o aumento da vascularização encontrada na membrana sinovial de doentes com AR. As células endoteliais na membrana sinovial são ativadas e expressam moléculas de adesão que promovem o recrutamento de células inflamatórias para dentro da articulação. Este processo é aumentado pela libertação de quimiocinas, tais como a IL-8, por células inflamatórias nas articulações ¹⁰⁸.

Os linfócitos T CD4⁺ ativados também estimulam linfócitos B, através da ligação da integrina $\alpha_1\beta_2$, CD154 (ligando CD40), e CD28, para produzir imunoglobulinas (Ig), incluindo o FR e ACPA. Estes e outros auto-anticorpos levam à formação de imunocomplexos, que conduzem à ativação do sistema do complemento ^{108,110}.

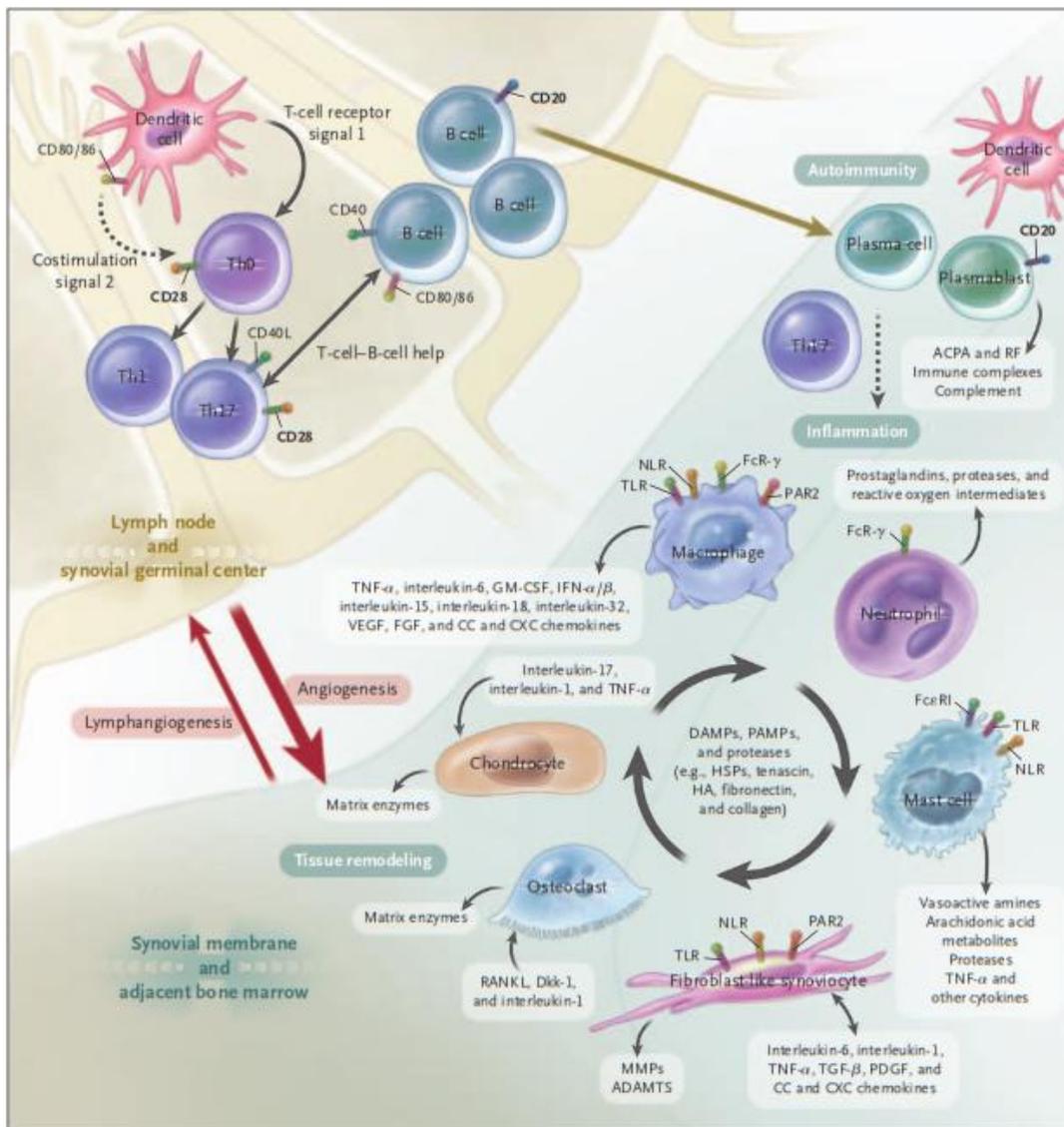


Figura 5. Processos da imunidade inata e da imunidade adaptativa envolvidos na patogênese da AR (Adaptado de McInnes & Schett., 2011 ³⁵).

As interações dependentes da co-estimulação entre as DCs, células T e células B são mostradas como ocorrendo principalmente no nódulo linfático; estes acontecimentos geram uma resposta autoimune contra proteínas do próprio contendo citrulina. Na membrana sinovial e na medula óssea adjacente, as vias da imunidade adaptativa e inata integram-se e promovem a remodelação do tecido e a sua degradação. O *feedback* positivo mediado pelas interações entre leucócitos, fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos, em conjunto com os produtos moleculares da lesão, conduzem à fase crónica na patogênese da AR.

Embora a AR seja convencionalmente considerada como uma doença mediada por um tipo de células Th1, a atenção tem-se centrado no papel das células Th17 (Th17), um subconjunto que produz IL-17A, IL-17F, IL-21, e IL-22 e TNF- α ³⁵.

Além de todas as funções das células T CD4⁺ descritas, estas células expressam ligandos de osteoprotegerina que estimulam a atividade de osteoclastos ¹⁰⁸.

Em relação ao sistema imunitário inato, várias células efetoras, incluindo macrófagos, mastócitos, DCs e células *natural killer* (células NK), encontram-se na membrana sinovial, enquanto os neutrófilos permanecem principalmente no líquido sinovial. O fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) aumentam a maturação das células, o seu efluxo a partir da medula óssea, e o transporte para a membrana sinovial ³⁵.

Os macrófagos são efetores centrais da sinovite; estes atuam através da libertação de citocinas (TNF- α e IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23), de espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de azoto (NOS), da produção de prostanoídes e de enzimas de degradação da matriz, da fagocitose, da apresentação de antígenos. Para além de serem ativados pela interação com linfócito T, os macrófagos são, também, ativados através dos recetores *toll-like* (TLR), citocinas e complexos imunes ³⁵.

Os neutrófilos contribuem para a sinovite através da síntese de prostaglandinas, proteases, elastase e ROS, que degradam o PG da camada superficial da cartilagem. A eliminação do PG permite a precipitação de imunocomplexos e expõe os condrócitos ³⁵.

Uma fração dos ACPA pertence à classe IgE, o que pode provocar a ativação de mastócitos, e produção de elevados níveis de aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas, e proteases ³⁵.

As DCs são passíveis de contribuir de diversas formas para a patogénese da AR. Primeiro, é claro a partir de modelos autoimunes que as DCs são capazes de mediar respostas autoimunes de linfócitos T e B, restritos pelo complexo major de histocompatibilidade (MHC) nos órgãos linfoides. Através deste processo, as DCs conduzem o desenvolvimento de auto-anticorpos e a patologia inflamatória crónica, características clínicas da AR. Estas APCs profissionais infiltram o tecido sinovial e o líquido sinovial e aqui são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos, contribuindo para a perpetuação da doença. Além disso, estas células, juntamente com sinoviócitos e macrófagos, produzem mediadores inflamatórios, que conduzem à patologia inflamatória na AR ¹³.

A produção de citocinas é crucial para a patogénese da AR e permite a ativação mútua do sistema imunitário inato e adaptativo. Várias células do sistema imunitário e células mesenquimais, incluindo monócitos, macrófagos, células T e fibroblastos, produzem citocinas. Os padrões de citocinas variam de acordo com a progressão da doença; a AR

precoce tem um perfil de expressão de citocinas aparentemente distinto, envolvendo a expressão de IL-4, IL-13 e IL-15, que, posteriormente evolui para doença crónica ³⁵. O TNF- α , a IL-1 e a IL-6 são as principais citocinas envolvidas na patogénese da AR, sendo que o TNF- α se encontra no “topo” da cascata inflamatória ¹⁰⁸. As principais citocinas envolvidas na patogénese da AR são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Citocinas envolvidas na patogénese da AR (*Adaptado de McInnes et al., 2011* ³⁵).

Citocina	Funções relevantes para a doença
TNF- α	Ativa leucócitos, células endoteliais e fibroblastos sinoviais, induzindo a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, e enzimas da matriz; suprime a função das células T reguladoras; ativa osteoclastos, e a reabsorção de cartilagem e de osso; medeia disfunções metabólicas e cognitivas.
IL-1 α e IL-1 β	Ativa leucócitos, células endoteliais e fibroblastos sinoviais; induz a produção de enzimas da matriz pelos condrócitos; ativa osteoclastos; induz a febre; aumenta o metabolismo da glucose; reduz a função cognitiva.
IL-6	Ativa leucócitos e osteoclastos; está envolvida na diferenciação de linfócitos B; regula o metabolismo lipídico, a resposta de fase aguda e anemia da doença crónica; está implicada na disfunção do eixo hipotálamo-pituitária e na fadiga.
IL-17 e IL-15	Promovem e mantêm a ativação de células T e células T de memória, bloqueiam a apoptose e mantêm as interações entre células T e macrófagos.
IL-17A e IL-17F	Agem sinergicamente para aumentar a ativação dos fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos.
IL-18	Promove a ativação de células Th1, neutrófilos e células NK.
IL-21	Ativa células Th17 e subtipos de células B
IL-23	Expandem células Th17
IL-32	Ativa a produção de citocinas por vários leucócitos e promove a diferenciação de osteoclastos.
IL-33	Ativa mastócitos e neutrófilos.

2.5.1 Alterações histológicas

A inflamação da membrana sinovial é central para a fisiopatologia da AR. Há evidências da angiogénese pronunciada, hiperplasia celular, influxo de leucócitos inflamatórios, alterações na expressão de moléculas de adesão da superfície celular, proteases, inibidores de proteases e expressão de diversas citocinas. As alterações sinoviais na patologia variam de acordo com a progressão da doença. Nas primeiras semanas da doença, o tecido edemacia-se e ocorre a deposição de fibrina e pode manifestar-se clinicamente com edema das articulações e dor. Num intervalo de tempo relativamente reduzido, o revestimento sinovial torna-se hiperplásico, geralmente adquire dez ou mais camadas de sinoviócitos do tipo A (tipo-

macrófagos) e tipo B (tipo-fibroblastos). A camada subíntima também sofre alterações significativas no número e tipo de células e no conteúdo, com infiltração predominante de células mononucleares, incluindo células T, células B, macrófagos e plasmócitos^{5,110}. A figura 6 representa as alterações histológicas observadas nos tecidos articulares de doentes com AR.

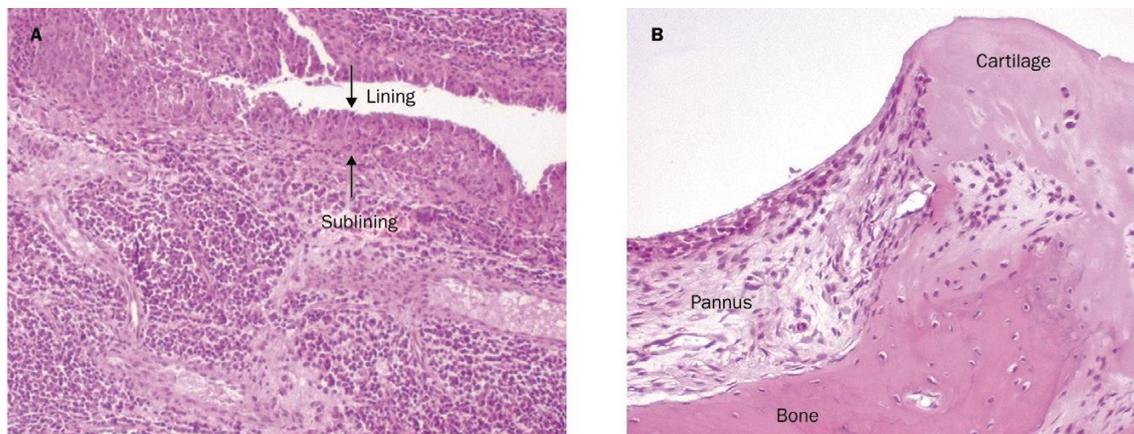


Figura 6. Tecidos articulares de doentes com AR (*Adaptado de Lee & Weinblatt, 2001¹¹⁰*).

A: Membrana sinovial inflamada com hiperplasia da camada de revestimento sinovial, delimitado pelas setas. Profundamente na camada de revestimento é um denso infiltrado inflamatório; B: O *pannus* sinovial a invadir o osso e a cartilagem.

A formação local de tecido sinovial invasivo, denominado *pannus*, é uma característica da patologia. Este tecido é envolvido nas erosões comuns observadas na AR. O *pannus* é histologicamente distinto de outras regiões da membrana sinovial e revela diferentes fases de progressão. Inicialmente, há penetração da cartilagem pelo *pannus* sinovial, constituído por células mononucleares e fibroblastos, com elevado nível de expressão de MMPs por células de revestimento sinovial¹¹¹⁻¹¹³. Em fases mais avançadas da doença, o *pannus* celular pode ser substituído por *pannus* fibrosos constituído por uma camada de células minimamente vascularizada e colagénio sobre a cartilagem¹¹⁴.

2.5.2 Danos estruturais

A hiperplasia sinovial é o principal contribuinte para os danos na cartilagem observados na AR. A perda dos efeitos protetores da membrana sinovial normal altera as características da proteína de ligação da superfície da cartilagem, promovendo a adesão de sinoviócitos tipo fibroblasto e a invasão. A síntese de MMPs por estas células (particularmente MMP-1, 3, 8, 13, 14, e 16) promove a destruição da rede de colagénio tipo II, um processo que altera o conteúdo de GAG e de retenção de água e leva diretamente à disfunção biomecânica. A MMP-14 parece ser a MMP predominantemente expressa pelos sinoviócitos tipo fibroblasto para degradar a matriz da cartilagem. Outras enzimas da matriz (por exemplo, ADAMTS 5, desintegrina e metaloproteinase) degradam o agregano e, assim, diminuem ainda mais a integridade desta estrutura³⁵.

Inibidores endógenos da enzima, como inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMPs), não conseguem reverter esta cascata destrutiva. Além disso, a cartilagem articular tem um potencial de regeneração limitado. Os condrócitos regulam fisiologicamente a formação da matriz e a sua clivagem, mas quando se encontram sob a influência de citocinas sinoviais (particularmente IL-1 e IL-17A) e de NOS, a cartilagem é progressivamente privada de condrócitos, que sofrem apoptose. Estes processos, em última análise, conduzem à destruição da superfície da cartilagem ³⁵.

A erosão óssea ocorre rapidamente, afetando 80% dos doentes, um ano após o diagnóstico e está associada à inflamação prolongada e aumentada. As citocinas sinoviais, particularmente o fator estimulador de colónias de macrófagos e o recetor ativador do ligando do fator nuclear (NF)-κB (RANKL), promovem a diferenciação dos osteoclastos e a invasão da superfície periosteal adjacente à cartilagem articular. O TNF-α e a IL-1, a IL-6 e, potencialmente, a IL-17 amplificam a diferenciação de osteoclastos e a sua ativação ³⁵.

Os osteoclastos têm um arsenal enzimático necessário para destruir tecidos mineralizados, incluindo cartilagem mineralizada e osso, e a destruição destes tecidos leva à reabsorção e ao preenchimento por tecido inflamatório ³⁵.

Fatores mecânicos predis põem locais específicos à erosão. Assim, o segundo e o terceiro metacarpos das mãos são propensos a alterações erosivas. A quebra do osso cortical permite o acesso sinovial para a medula óssea, o que provoca a inflamação da medula óssea (osteíte), em que os agregados de células T e de células B gradualmente substituem a medula. Não está claro se essas lesões ocorrem em conjunto com as erosões induzidas pela sinovite, ou se a osteíte necessariamente ou independentemente precede a erosão. É concebível que a lesão primordial da AR se inicie na medula óssea e apenas posteriormente envolva a membrana sinovial ³⁵.

2.5.3 Consequências sistêmicas

Os efeitos da inflamação sistêmica observada na AR contribuem substancialmente para o risco de mortalidade prematura. Os doentes com manifestações extra-articulares têm um risco aumentado de desenvolver doença cardiovascular ou infeções graves ¹³.

Manifestações extra-articulares graves (incluindo vasculite, neuropatia associada à vasculite, síndrome de Felty, glomerulonefrite, pericardite, pleurite, e esclerite), desenvolvem-se em aproximadamente 15% dos doentes caucasianos com AR durante o longo período de acompanhamento ¹³.

Os mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, imunocomplexos e alterações do metabolismo dos lípidos promovem várias condições coexistentes em doentes com AR, como é representado na figura 7 ³⁵.

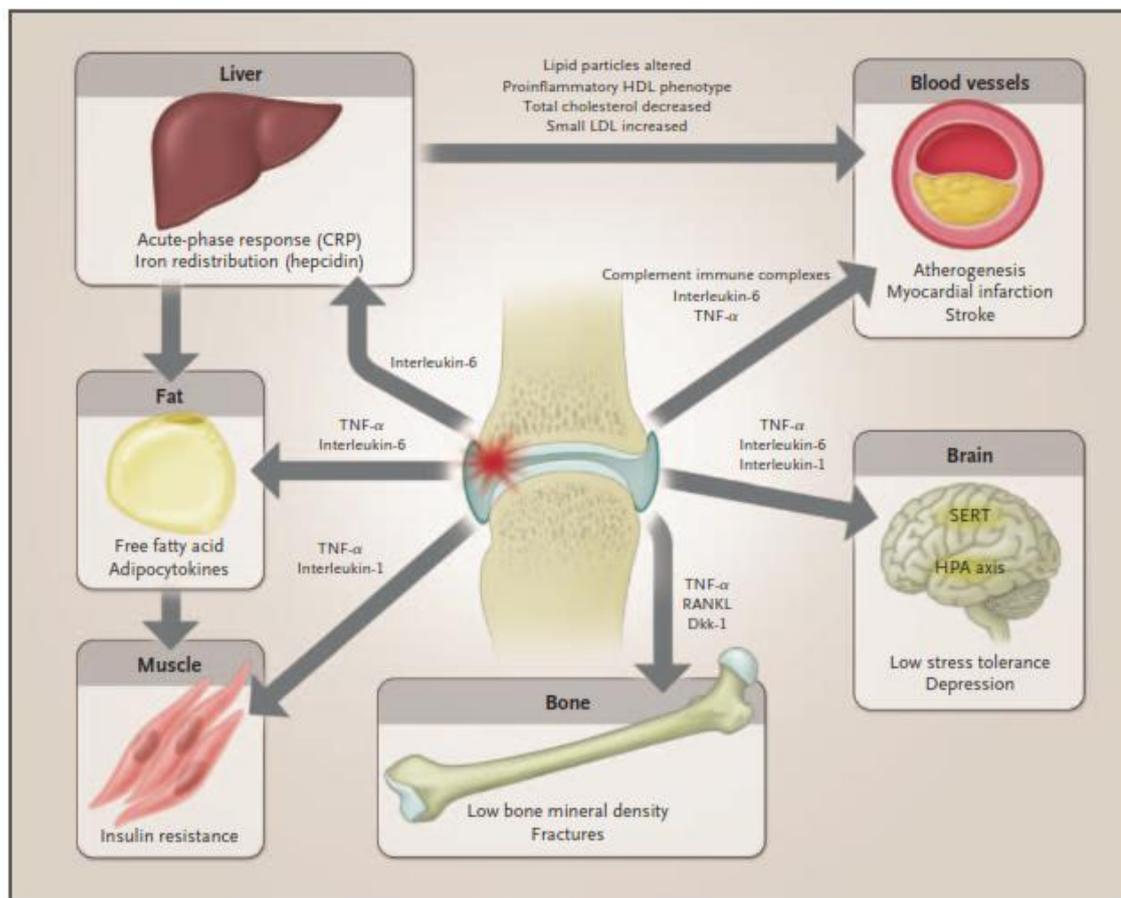


Figura 7. Mecanismos subjacentes às complicações sistêmicas observadas em doentes com AR (*Adaptado de McInnes & Schett, 2011* ³⁵).

(Legenda: CRP - proteína reativa C, HDL - lipoproteína de alta densidade; HPA - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; LDL - lipoproteína de baixa densidade; SERT - transportador de serotonina SERT).

Os sinais de inflamação sistêmica em doentes com AR incluem sintomas constitucionais, como fadiga, febrícula, perda de peso e níveis elevados de marcadores inflamatórios e ainda velocidade de sedimentação (VS) e a CRP aumentadas. A inflamação sistêmica não controlada na AR está associada a diversas complicações a longo prazo. A alta atividade da doença e elevação persistente dos níveis de biomarcadores inflamatórios estão associados à amiloidose tecidual e danos a órgãos ¹¹⁵.

A AR está associada ao aumento dos riscos de doença cardiovascular, incluindo enfarte do miocárdio, acidentes cardiovasculares e insuficiência cardíaca ¹¹⁶⁻¹¹⁸. As vias inflamatórias que estão implicadas incluem citocinas (IL-6 e TNF- α), proteínas de fase aguda, que são um fator de risco cardiovascular, na população em geral, imunocomplexos e partículas lipídicas alteradas, que aumentam a ativação endotelial e potencialmente tornam as placas ateroscleróticas instáveis ¹¹⁹⁻¹²⁰. Características lipídicas estão intimamente, e reciprocamente, ligadas à inflamação para garantir a defesa metabolicamente eficiente do hospedeiro. Em consequência, a AR ativa, está relacionada à redução dos níveis séricos de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), e lipoproteína de baixa densidade (LDL), que podem

então estar paradoxalmente elevados por terapia eficaz ¹²¹. No entanto, terapêuticas eficazes diminuem o risco cardiovascular e modificam favoravelmente a fisiologia vascular ¹²²⁻¹²⁴.

Neste sentido, tem sido proposta a avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-β2-glicoproteína 1 (anti-β2-GP1) e anticorpos anti-LDL oxidada (anti-oxLDL) para a avaliação do risco cardiovascular em doentes com AR. Pensa-se que as lipoproteínas oxidadas contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose. Diversas linhas de evidência mostraram que a oxidação de LDL (oxLDL) e a oxidação da lipoproteína A induzem a acumulação intracelular de ésteres de colesterol nos macrófagos, o que leva à sua transformação em “células-espuma”. Além disso, ambas as lipoproteínas oxidadas induzem a expressão de moléculas de adesão em monócitos, promovendo o seu recrutamento e a adesão ao endotélio. As lipoproteínas oxidadas também têm demonstrado estar envolvidas na aterosclerose autoimune. Recentemente, observou-se que a oxLDL interage com β2-GP1, um dos principais auto-antígenos para o anticorpo anticardiolipina encontrados no soro de doentes com patologias autoimunes, e forma um complexo pró inflamatório estável β2-GP1-oxLDL na camada íntima arterial das lesões ateroscleróticas. Estes complexos são fagocitados por macrófagos via anti-β2-GPI, num processo mediado por anticorpos. O aumento das concentrações do complexo β2-GP1-oxLDL foi observado na corrente sanguínea de doentes com patologias autoimunes, tais como o lúpus eritematoso sistémico e síndrome antifosfolípido. Vários estudos demonstraram que as lipoproteínas oxidadas e as concentrações de oxLDL estão aumentadas em doentes com AR com eventos cardiovasculares graves ¹²⁵.

A inflamação na AR também afeta o cérebro (fadiga e diminuição da função cognitiva), fígado (resposta de fase aguda elevada e anemia da doença crónica), pulmões (doença inflamatória e fibrose), as glândulas exócrinas (síndrome de Sjögren secundário), músculos (sarcopenia), e ossos (osteoporose) ³⁵. A osteoporose afeta o esqueleto axial e apendicular, com modesto aumento da resposta de fase aguda ou inflamação subclínica, e provavelmente ocorre antes do início da doença articular ³⁵.

3. Terapêutica Biológica

Durante as últimas décadas, registou-se um progresso notável no desenvolvimento de terapêuticas biológicas específicas, tais como anticorpos monoclonais e proteínas de fusão. A tecnologia que permite a produção de anticorpos monoclonais foi inicialmente descoberta há três décadas atrás ¹²⁶ e rapidamente revolucionou o tratamento de doenças, no contexto de células estaminais, transplante de órgãos, doenças reumáticas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias dos intestinos, infeções e doenças atópicas. Inicialmente, os anticorpos monoclonais foram usados como veículos de medicamentos para tecidos-alvo e mais tarde, foram produzidos para atuarem diretamente para moléculas e células de interesse ¹²⁷.

A terapêutica biológica tem-se revelado particularmente importante no tratamento das doenças autoimunes, cuja etiologia permanece desconhecida. Esta pode ser dividida em dois grupos, de acordo com o tipo de alvo biológico. Assim, a terapêutica biológica pode ser dirigida para moléculas da superfície celular ou para moléculas secretadas pelas células. As moléculas da superfície celular podem servir como marcadores específicos para uma determinada célula, e podem então ser produzidos anticorpos monoclonais dirigidos para esses alvos, com o objetivo de eliminar ou manipular essas células. Outra classe de moléculas liga a proteínas da superfície celular e interferem com a sua função, sem eliminar ou matar as células alvo. Os agentes biológicos mais utilizados interferem com a ação de citocinas, que são mediadores solúveis de inflamação. As citocinas exercem a sua ação ligando-se a recetores de superfície celular. A ação destes mediadores pode ser bloqueada através da ligação da citocina solúvel ou impedindo a sua ligação ao seu recetor. O primeiro pode ser conseguido através da utilização de anticorpos monoclonais contra a citocina ou utilizando um recetor solúvel sintético, que irá ligar-se às citocinas de uma forma semelhante à dos recetores da superfície das células, reduzindo assim os níveis de citocinas livre, ou seja, diminuindo os níveis biologicamente ativos ¹²⁷.

O ponto de partida para a produção de fármacos biológicos foi a identificação de alvos terapêuticos. Para tal, foram necessários muitos anos de investigação acerca dos mecanismos moleculares subjacentes à fisiopatologia das doenças autoimunes. A caracterização de aspetos específicos da resposta imunológica na AR, seguida de uma década ou mais de pesquisa de laboratório, entre o final dos anos 80 e o início dos anos 90, permitiu identificar moléculas e sinais-chave envolvidos na patologia da AR ¹²⁸.

A primeira tentativa para identificar possíveis alvos terapêuticos na AR estava focada nas células, em detrimento das moléculas, enquanto que alguns grupos conduziam pesquisas que tinham como alvos citocinas inflamatórias ¹²⁸.

As primeiras experiências mostraram que culturas de células da membrana sinovial, obtidas de doentes com AR, produziam continuamente moléculas inflamatórias, incluindo as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , após vários dias da colheita ¹²⁹. Com esta descoberta, tornou-se um problema definir quais as citocinas poderiam ser usadas como alvos terapêuticos ¹³⁰.

Neste contexto, Brennan e os seus colaboradores, em 1989, realizaram um estudo *in vitro* que demonstrou que o bloqueio do TNF- α numa cultura celular com anticorpos anti-TNF- α (cA2), resultou na redução dos níveis de citocinas inflamatórias, particularmente IL-1, mas também outras citocinas pró-inflamatórias. Este estudo em conjunto com estudos posteriores, estabeleceram o TNF- α como a citocina principal da cascata de citocinas pró-inflamatórias e como um regulador da mesma ¹³¹⁻¹³².

Portanto, a escolha racional do TNF- α como alvo deveu-se não só à sua presença em elevadas concentrações nas articulações de doentes com AR, mas também a outros estudos que

demonstraram que esta citocina induz outras citocinas inflamatórias na rede sinovial. Além disso, experiências adicionais revelaram que em modelos animais de artrite são suprimidos por inibidores do TNF¹³³.

Contudo, o TNF- α não é a única citocina envolvida na patogénese da AR. Tanto a IL-1, como a IL-6 desempenham um papel importante na patogénese da doença e estudos revelaram que a sua inibição permite um controlo efetivo da doença. Além disso, também a eliminação de células B CD20⁺ e o bloqueio do sinal co-estimulatório (CD28-CD80/86) entre células T e APCs têm-se revelado abordagens eficazes no tratamento desta patologia^{108,134}.

Estes agentes têm vindo a ser aprovados para o tratamento de várias doenças inflamatórias imunomediadas (IMIDs), incluindo a AR, artrite psoriática, espondilite anquilosante, psoríase, doença de Crohn, colite ulcerosa e artrite idiopática juvenil¹³⁵⁻¹³⁶.

Assim, atualmente estão disponíveis no mercado, fármacos biológicos direcionados para as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 e para as células-chave (células B e T) na patogénese da AR. Estes fármacos são apresentados na tabela 3¹⁰⁹.

Tabela 3. Agentes biológicos no tratamento da AR (*Adaptado de Kuek et al, 2006¹³⁵*).

Fármaco	Classe	Estrutura	Alvo
Infliximab	Inibidor de citocina	Anticorpo quimérico murino/humano	TNF- α
Etanercept	Inibidor de citocina	Proteína de fusão	TNF- α e TNF- β
Adalimumab	Inibidor de citocina	Anticorpo humanizado	TNF- α
Certolizumab pegol	Inibidor de citocina	Anticorpo humanizado com um fragmento Fab' conjugado com o polietilenoglicol	TNF- α
Golimumab	Inibidor de citocina	Anticorpo humanizado	TNF- α
Tocilizumab	Inibidor de citocina	Anticorpo humanizado	IL-6
Anakinra	Inibidor de citocina	Antagonista do recetor da IL-1	IL-1
Abatacept	Bloqueador da co-estimulação	Proteína de fusão	CD80 e CD86
Rituximab	Agente eliminador de células	Anticorpo quimérico murino/humano	CD20 ⁺

Em Portugal o grupo de trabalho da AR da Sociedade Portuguesa de Reumatologia (SPR) apresentou critérios consensuais para início e manutenção da terapêutica biológica na AR. Para início de terapêutica biológica os doentes com AR devem ter um DAS28 superior a 3,2, após pelo menos 3 meses de tratamento com MTX na dose de 20mg/semana, ou, na impossibilidade de tratamento com MTX nesta dose, após 6 meses de outro DMARD convencional ou associação terapêutica. Está previsto também o início de terapêutica biológica em doentes que, sob terapêuticas convencionais, apresentem um DAS28 entre 2,6 e 3,2 e tenham uma degradação funcional ou radiológica significativa¹³⁷.

O objetivo terapêutico deve visar a remissão ou, pelo menos, uma diminuição da atividade da doença traduzida por um DAS28 inferior a 3,2 sem degradação funcional ou radiológica significativa. Assim, são considerados critérios de resposta após os primeiros 3 meses de terapêutica, a verificação de uma redução do DAS28 superior a 0,6. A partir dos 6 meses de terapêutica considera-se a existência de resposta clínica se os doentes apresentarem uma redução do DAS28 superior a 1,2. Nos doentes considerados não respondedores o clínico assistente poderá optar por mudar para outro agente biológico ¹³⁷.

3.1 Antagonistas do TNF- α

O TNF foi descoberto em 1975 por Carswell e colaboradores no soro de ratos infetados com o *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Estes autores identificaram o TNF como uma proteína do soro derivada de macrófagos estimulados por uma endotoxina, e capaz de causar lise de células tumorais *in vivo* ¹³⁸. Tornou-se imediatamente evidente que o TNF- α produziu outros efeitos, incluindo a capacidade de induzir sinais e sintomas de choque e danos em múltiplos órgãos através de efeitos pró-inflamatórios no endotélio vascular ¹³⁹.

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica, que desempenha um papel central na cascata de citocinas pró-inflamatórias ^{136,140}. Esta citocina exerce uma variedade de efeitos fisiológicos e patológicos, incluindo a proliferação, inflamação, diferenciação e morte celular ^{136,141-144}.

O TNF- α desempenha um papel no desenvolvimento do sistema linfóide e tem um papel homeostático na defesa do hospedeiro. Este importante mediador imunológico tem sido denominado como uma “citocina sentinela”, uma vez que inicia a resposta de defesa à lesão local ¹⁴⁵. Em baixas concentrações nos tecidos, pensa-se que o TNF- α tenha efeitos benéficos, tais como o aumento de mecanismos de defesa do hospedeiro contra infeções ¹³⁶. Por outro lado, como já foi referido, esta citocina encontra-se no topo da cascata inflamatória, sendo responsável pela sua iniciação e perturbação ¹⁴¹. Em concentrações elevadas, o TNF- α pode levar à inflamação em excesso e lesões de órgãos. A libertação rápida de quantidades muito grandes de TNF- α durante a sepsis, pode resultar em choque séptico. Em estados de doença, o TNF- α é geralmente considerado como uma citocina pró-inflamatória, juntamente com a IL-1, IL-17, e outras citocinas ¹³⁶.

O TNF- α é produzido por diferentes tipos de células imunológicas e não imunológicas, incluindo macrófagos, linfócitos T, mastócitos, granulócitos, células NK, fibroblastos, neurónios, queratinócitos e células musculares lisas ^{136,146}.

O TNF- α é reconhecido por desempenhar um papel chave em muitas IMIDs, tais como AR, espondiloartrite, psoríase, doença inflamatória do intestino, lúpus eritematoso, doença de Crohn, entre outras ^{135,141,146}. Como é mostrado na figura 8, algumas atividades do TNF- α são comuns a várias doenças, tais como a modulação do recrutamento celular, proliferação celular, morte celular e regulação imunológica ^{108,147}.

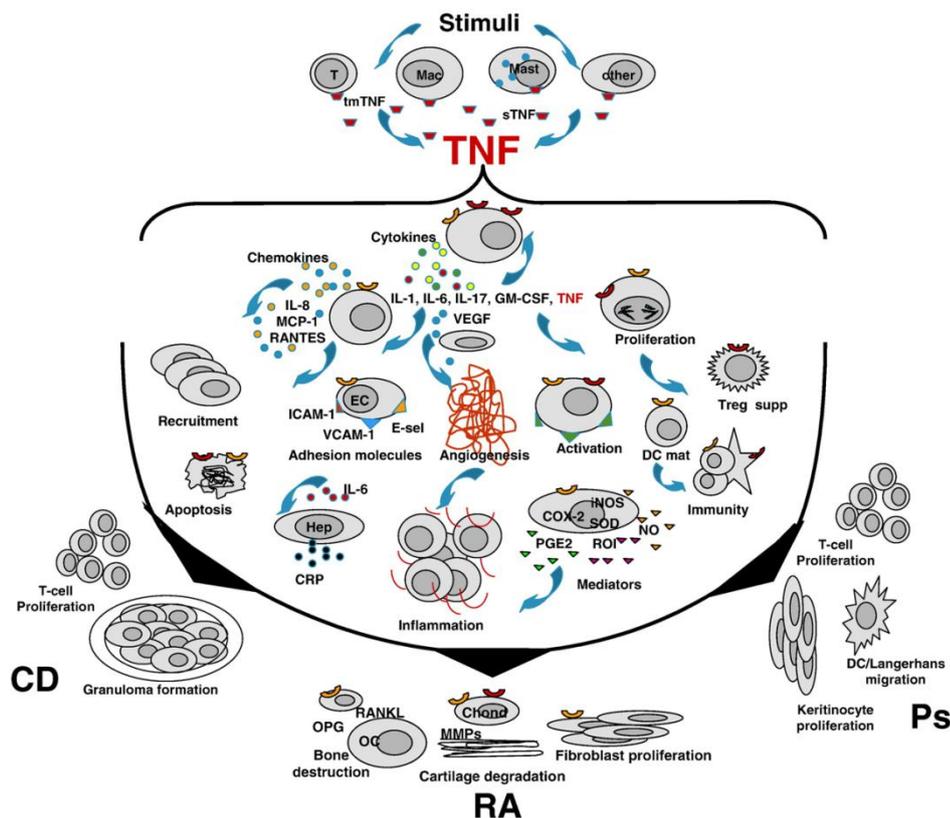


Figura 8. Papel do TNF- α na patogênese da AR (Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶).

O TNF- α é produzido em elevadas concentrações por uma variedade de tipos celulares, presumivelmente induzidos por estímulos endógenos ou microbianos na patogênese da AR, doença de Crohn e psoríase. Uma cascata e uma rede de respostas celulares mediadas pelo TNF- α , que são comuns a estas três doenças são mostradas na área fechada no centro do diagrama. Os mecanismos e as características celulares restritas a uma doença particular são mostrados fora da área fechada.

A demonstração de que o TNF- α poderia ter um papel importante na fisiopatologia da AR partiu, essencialmente, de quatro evidências experimentais: primeiro, demonstrou-se que esta citocina tinha capacidade para degradar cartilagem e osso *in vitro*; segundo, observou-se em modelos animais que o TNF- α tinha propriedades artritogênicas; terceiro, provou-se a colocalização deste mediador com os seus recetores no tecido sinovial e nas articulações na AR; em último lugar, demonstrou-se que o TNF- α tinha um papel central na regulação da produção de IL-1 em culturas de células sinoviais derivadas de AR (constituídas por linfócitos, macrófagos, DCs, células endoteliais e fibroblastos)^{129,139}.

O TNF- α é uma citocina chave da patogênese da AR, por se situar no “topo” da cascata das citocinas pró-inflamatórias e consequente rede de respostas celulares¹³⁶.

O TNF- α é um estimulador autócrino e um potente indutor parácrino de outras citocinas inflamatórias, incluindo a IL-1, IL-6, IL-8, o GM-CSF e proteínas de fase aguda, como a CRP^{108,129}. Este mediador também promove a inflamação através da estimulação de fibroblastos para expressar moléculas de adesão¹⁰⁸. Estas moléculas de adesão interagem com os seus

respetivos ligandos na superfície de leucócitos, resultando no aumento da recirculação linfocitária¹⁰⁸.

Os macrófagos ativados são a principal fonte de TNF- α no tecido sinovial inflamado, e o número de macrófagos e o grau de expressão desta citocina estão correlacionados com a evolução da doença¹⁴⁸. Os estímulos que induzem a manutenção da produção de TNF- α nos macrófagos sinoviais não são conhecidos com precisão, mas interações célula-célula, citocinas, imunocomplexos, complemento, produtos microbianos, ligandos endógenos para o TLR e hipoxia, são candidatos prováveis. A IL-17 induz a produção de TNF- α a partir de macrófagos e pensa-se que possa induzir também a sua produção nas articulações¹³⁶.

Inicialmente, a membrana sinovial que reveste o espaço da articulação fica inflamada, como consequência do aumento da vascularização e do influxo de células inflamatórias¹³⁶. As concentrações séricas e sinoviais de TNF- α e IL-1 são elevadas em doentes com a patologia ativa. Estas duas citocinas são suscetíveis de ter o papel primário na patogénese da doença. Além disso, o TNF- α e a IL-1 são estimuladores potentes de células mesenquimais, tais como fibroblastos sinoviais, osteoclastos, e condrócitos, que libertam MMP, levando à destruição dos tecidos. Estes mediadores do processo inflamatório também inibem a produção de TIMPs por fibroblastos sinoviais. Estas ações duplas conduzem provavelmente a lesões articulares. O TNF- α estimula o desenvolvimento de osteoclastos, responsáveis pela degradação do osso, presumivelmente pela indução da produção de IL-11¹⁰⁸.

Atualmente, existem cinco antagonistas do TNF- α aprovados na Europa para o tratamento da AR e de muitas outras doenças inflamatórias e autoimunes: infliximab (IFX), etanercept (ETA), adalimumab (ADA), certolizumab pegol (CZP) e golimumab (GOL)¹⁴⁹, e estes constituem a primeira linha de escolha de fármacos biológicos para o tratamento da AR.

Neste capítulo, irão ser apresentadas as estruturas moleculares de cada um destes agentes, bem como os seus mecanismos de ação.

3.1.1 Infliximab

O IFX é um anticorpo monoclonal quimérico, de isotipo IgG1, com 25% de origem murina, que contem os domínios V_H (domínio N terminal variável da cadeia pesada) e V_L (domínio N terminal variável da cadeia leve) e com 75% de origem humana, que correspondem as regiões constantes da cadeia pesada (C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}) e ao fragmento cristalizável (Fc)^{127,136}. O modelo da sua estrutura molecular é apresentado na figura 9.

Esta molécula tem elevada afinidade e especificidade para as formas monomérica, trimérica e transmembranar do TNF- α , ligando-se a este e formando complexos imunes estáveis, não dissociáveis¹⁵⁰. Este agente impede a interação do TNF- α com os seus recetores p55 e p75, bloqueando o início do sinal intracelular e a subsequente atividade biológica. A ligação do IFX

ao TNF- α membranar *in vitro* resulta na lise celular mediada pelo sistema do complemento ou por mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) ¹⁵¹⁻¹⁵². Não tem afinidade para o fator de necrose tumoral beta (TNF- β ou linfotoxina- α) ¹⁵³.

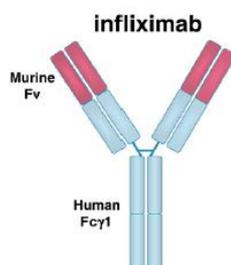


Figura 9. Modelo da estrutura molecular do IFX (Adaptado de Tracey et al., 2008 ¹³⁶).

3.1.2 Etanercept

O ETA é uma proteína de fusão solúvel, totalmente humanizada, produzida por tecnologia de DNA recombinante. Resulta da fusão da porção Fc da IgG humana, com a porção extracelular do recetor do TNF II (TNFRII, p75), um dos dois recetores do TNF- α ^{127,136}. A porção Fc ajuda a reter a molécula na circulação ¹⁵⁴. O modelo da sua estrutura molecular é apresentado na figura 10. Este antagonista do TNF- α liga-se de forma estável à forma trimérica do TNF- α solúvel e ao TNF- β , impedindo-os de interagir com os seus recetores. Interage também com a forma monomérica do TNF- α e com o TNF- α transmembranar, mas de uma forma transitória e com baixa afinidade ¹⁵⁵. Embora a região Fc contenha o domínio de ligação ao complemento, o ETA não liga moléculas do complemento, nem lisa células que expressem o TNF *in vitro* ¹⁵².

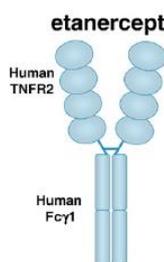


Figura 10. Modelo da estrutura molecular do ETA (Adaptado de Tracey et al., 2008 ¹³⁶).

3.1.3 Adalimumab

O ADA é um anticorpo monoclonal quimérico, de isotipo IgG1, semelhante ao IFX, no entanto, totalmente humanizado ^{127,136}. O modelo da sua estrutura molecular é apresentado na figura 11. Este fármaco liga-se a ambas as formas solúvel e transmembranar do TNF- α com elevada afinidade e neutraliza a sua função biológica, bloqueando a sua interação com os recetores do TNF- α da superfície celular, p55 e p75 ¹⁵⁶. Estudos *in vitro* demonstraram também a capacidade do ADA em induzir a lise celular e a apoptose ¹⁵⁷.

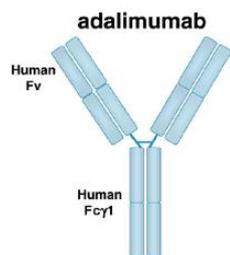


Figura 11. Modelo da estrutura molecular do ADA (Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶).

3.1.4 Certolizumab Pegol

O CZP é um anticorpo recombinante humanizado, formado por um fragmento Fab' de um anticorpo monoclonal humano de isotipo IgG1, expresso na *Escherichia coli*, conjugado com polietileno glicol (PEG)^{130,136}. O CZP encontra-se ligado a duas cadeias de PEG com vista a melhorar a sua solubilidade e o seu tempo de semivida (Weir, 2006). O modelo da sua estrutura molecular é apresentado na figura 12. Este antagonista não contém a região Fc e como tal não tem a capacidade de ativar o complemento, nem a lise celular mediada pelo complemento, nem a citotoxicidade dependente de anticorpos¹³⁶.

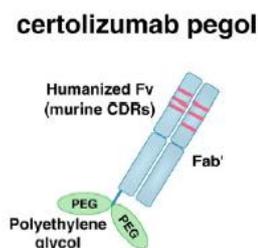


Figura 12. Modelo da estrutura molecular do CZP (Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶).

3.1.5 Golimumab

O GOL é um anticorpo monoclonal humano, específico para o TNF- α e liga ambas as formas solúvel e transmembranar do TNF- α humano. Este fármaco forma complexos estáveis com TNF- α , impedindo a sua interação com os seus recetores (p55 e p75). A ligação do GLM ao TNF- α humano neutraliza a sua função biológica e reduz o processo inflamatório^{130,136}. O modelo da sua estrutura molecular é apresentado na figura 13.

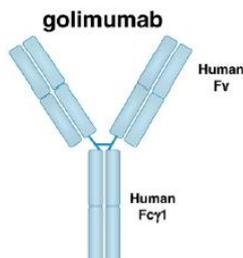


Figura 13. Modelo da estrutura molecular do GOL (Adaptado de Tracey et al., 2008¹³⁶).

3.2 Antagonistas da IL-6 - Tocilizumab

A IL-6 desempenha um papel central na patogénese da AR e é uma citocina pleiotrópica. Este mediador estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, é responsável pela ativação de linfócitos T, estimula a ativação e diferenciação de osteoclastos e induz a resposta hepática de fase aguda e anemia da inflamação ¹⁵⁸. As vias inflamatórias ativadas pela IL-6 são apresentadas na figura 14.

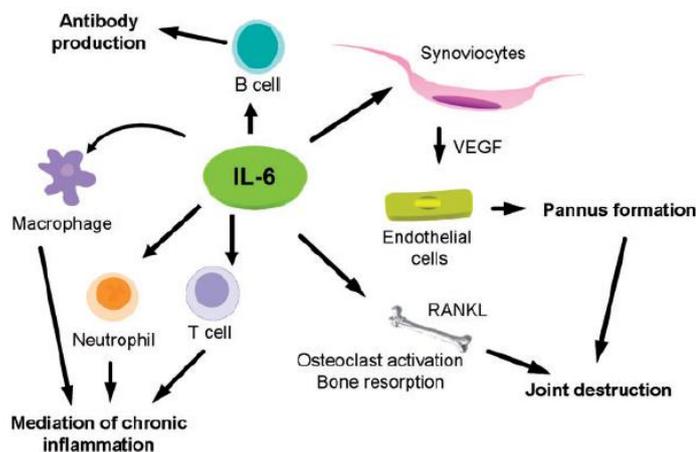


Figura 14. Vias inflamatórias ativadas pela IL-6 (Adaptado de Dayer & Choy, 2010 ¹⁵⁹).

Ao nível da articulação, IL-6 tem um papel central no processo inflamatório, na reabsorção óssea mediada por osteoclastos e no desenvolvimento do *pannus* através de maior expressão do fator de crescimento do endotélio vascular VEGF. Além disso, a IL-6 pode contribuir para a indução e a manutenção do processo autoimune através da modulação dos linfócitos B e diferenciação de células Th17 ¹⁵⁹.

A IL-6 encontra-se em concentrações elevadas no soro e na membrana sinovial de doentes com AR e os seus níveis séricos são indicadores da inflamação sistémica. Por estes motivos, a IL-6 tornou-se um alvo terapêutico e consequentemente levou ao desenvolvimento de anticorpos dirigidos contra o recetor da IL-6. Atualmente, apenas o TCZ se encontra aprovado ¹⁵⁸.

O TCZ é um anticorpo humanizado dirigido contra o recetor da IL-6, constituído pela porção Fab murina conjugada com IgG1 humana. Este fármaco liga seletiva e competitivamente os recetores da IL-6 solúveis e membranares, antagonizando assim a ação da IL-6 endógena ¹⁶⁰.

Na prática clínica, o TCZ é prescrito a doentes com AR, nos quais o tratamento com, pelo menos, um antagonista do TNF- α tenha falhado ¹⁵⁸.

3.3 Antagonistas da IL-1 - Anakinra

A IL-1 tem um papel proeminente na inflamação sinovial. Os níveis desta citocina encontram-se aumentados no plasma e no líquido sinovial de doentes com AR e as suas concentrações têm sido correlacionadas com a atividade da doença ¹⁶¹.

A IL-1 exerce uma variedade de efeitos que contribuem para a patogénese da AR, como é mostrado na figura 15. Esta citocina induz a ativação de células T, promove a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos, estimula a liberação de protease por macrófagos e aumenta a infiltração destas moléculas nos tecidos inflamados. A IL-1 aumenta a proliferação de fibroblastos, levando à formação do *pannus* e estimula a produção de prostaglandina E2 (PGE2) ¹⁶².

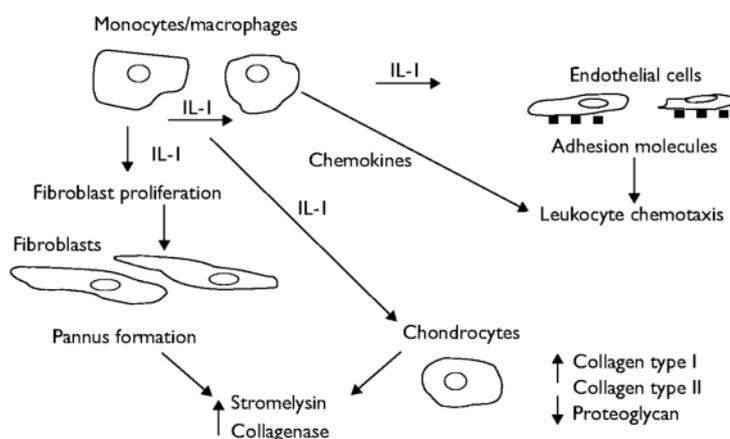


Figura 15. Papel da IL-1 na patogénese da inflamação e da destruição articular na AR (*Adaptado de Furst, 2004* ¹⁶²).

Através da ativação de condrócitos e fibroblastos sinoviais, a IL-1 contribui para a destruição da cartilagem, ossos e tecidos periarticulares. Os efeitos da IL-1 na cartilagem incluem um aumento na degradação do PG e uma diminuição na sua síntese. O aumento da degradação de PG é induzido através da produção de MMP como a collagenase e a estromelisin, que são potentes enzimas de degradação do tecido conjuntivo. A IL-1 também altera a produção de colagénio pelos condrócitos, diminuindo a produção de colagénio tipo II, o principal constituinte da cartilagem, e aumentando a produção de colagénio tipo I ¹⁶².

A AKR é um antagonista, não glicosilado, do recetor celular humano da IL-1 e é produzido em células da *Escherichia coli* por tecnologia de DNA recombinante ¹⁶²⁻¹⁶³. Este fármaco atua inibindo por competição a ligação da IL1 ao seu recetor tipo 1 ¹⁶⁴.

3.4 Inibidores de linfócitos B - Rituximab

Os linfócitos B estão extensivamente representados na membrana sinovial de doentes com AR e exercem uma variedade de funções que apoiam o seu importante papel na patogénese da doença. Para além das células B atuarem como APCs, também fornecem a sinalização co-

estimulatória crítica para a ativação de linfócitos T CD4+ e produzem citocinas¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Quando os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de anticorpos, estes produzem auto-anticorpos, como o FR e anticorpos anti-CCP, que conjuntamente com os respetivos antígenos formam complexos imunes, que promovem a inflamação e destruição articular^{51,167}. Atualmente, apenas se encontra aprovado um agente inibidor de linfócitos B, o RTX. No entanto, novos fármacos estão a ser desenvolvidos e investigados neste contexto terapêutico¹⁵⁸.

O RTX é um anticorpo monoclonal quimérico, dirigido contra o antígeno CD20 dos linfócitos B. Este antígeno está presente na superfície celular dos linfócitos B, nas diferentes fases do seu desenvolvimento desde a fase de pré-células B até as células B ativadas e desaparece quando estas se diferenciam em plasmócitos¹⁵⁸. Na figura 16 é representado o alvo molecular do RTX.

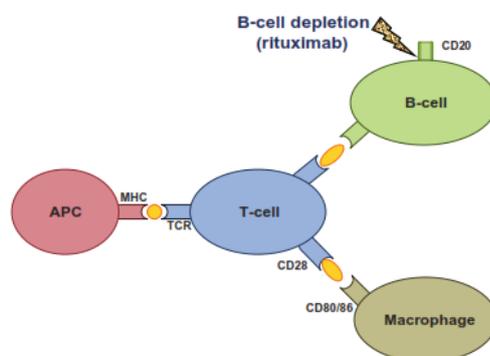


Figura 16. Alvo molecular do RTX (Adaptado de Kukar et al., 2009¹⁶³).

A ligação ao antígeno CD20 das células B conduz à morte e depleção destas células. Os mecanismos responsáveis pela morte celular são a citotoxicidade mediada por anticorpos, a lise mediada pelo complemento e a apoptose¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. Apesar da profunda depleção das células B, induzida por este tratamento, não se verificou na maior parte dos estudos realizados com este fármaco efeitos de toxicidade grave¹⁷⁰.

Na prática clínica, o RTX é prescrito a doentes com AR, nos quais o tratamento com, pelo menos, um antagonista do TNF- α falhou¹⁷¹⁻¹⁷³. Este fármaco também é usado como primeira escolha em doentes com contra-indicação absoluta ou relativa para a utilização de antagonistas do TNF- α ¹⁷⁰.

3.5 Bloqueadores da ativação linfócitos T - Abatacept

Os linfócitos T, particularmente os linfócitos T auxiliares, desempenham um papel crucial na fisiopatologia da AR, tal como foi descrito. A ativação das células T CD4+ requer a apresentação antígenica pelas APCs e a co-estimulação via CD80/86 e CD28, respetivamente expressas nas APCs e nos linfócitos T. Após serem ativadas, as células T passam a expressar o antígeno 4 associado ao linfócito T (CTLA4), que é uma imunoglobulina imunorreguladora,

que se liga às moléculas CD80 e CD86, com afinidade 500 a 2500 vezes superior ao CD28. Esta interação tem como objetivo terminar a resposta dos linfócitos T ¹⁷⁴.

O ABT é uma proteína de fusão totalmente humanizada, solúvel, que compreende o domínio extracelular de CTLA4 humano, ligado à porção Fc modificada da IgG1 humana modificada, formando o complexo Ig-CTLA4 ¹⁷⁵. Na figura 17 encontra-se representado o alvo molecular do ABT.

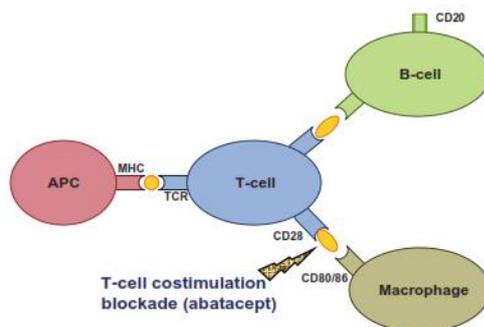


Figura 17. Alvo molecular do ABT (Adaptado de Kukar et al., 2009 ¹⁶³).

Este agente tem uma elevada afinidade de ligação para CD28 e compete com este marcador para a ligação ao CD80/86, interferindo assim com a ativação das células T ¹⁷⁶⁻¹⁷⁷. O ABT é também responsável pela redução da ativação das células T de memória e impede as células T de induzir diferenciação de células B em plasmócitos. Como tal, afeta principalmente a imunidade adaptativa ou imunidade antigénio específica, com menor efeito sobre a imunidade inata ¹⁷⁸.

Na prática clínica, o ABT encontra-se aprovado para doentes com AR, nos quais o tratamento com DMARDs convencionais ou antagonistas do TNF- α tenha falhado ¹⁵⁸.

3.6 Eficácia

A eficácia dos fármacos biotecnológicos no tratamento da AR e de muitas outras IMIDs tem sido demonstrada através da realização de ensaios clínicos um pouco por todo o mundo.

Em geral, estes ensaios usam os parâmetros definidos pela ACR e a EULAR para avaliar a eficácia dos antagonistas do TNF- α no tratamento da AR, como os critérios ACR, DAS28 e HAQ, entre outros ¹⁷⁹.

Uma das medidas usadas para avaliar a atividade da doença são os critérios ACR20, 50, 70 e 90, que indicam as melhorias clínicas de 20, 50, 70 e 90%, respetivamente, em vários parâmetros, como o número de tendões e articulações inchadas, os níveis de CRP, medidas da dor por meio de uma escala visual analógica, e a avaliação global do médico ou do doente ¹⁷⁹.

Outra medida importante é a avaliação da extensão do dano articular avaliada por meio de radiografias simples, através do índice de Sharp modificado ¹⁷⁹.

No geral, todos os inibidores do TNF- α demonstraram uma eficácia excelente em doentes AR. Estes agentes conduzem a melhorias nos sinais e sintomas (dor nas articulações e inchaço), nos parâmetros laboratoriais de inflamação (VS e CRP) e retardam ou impedem a progressão radiográfica da lesão articular ¹³.

Os efeitos terapêuticos dos agentes anti-TNF- α são claramente melhores do que os obtidos com DMARDs convencionais, mas alguns doentes não respondem a esta terapia. No entanto, vários estudos demonstraram que os doentes que entraram em falha terapêutica com um inibidor do TNF- α , ainda podem responder bem a qualquer um dos outros ¹⁸⁰.

Também a eficácia do RTX tem sido demonstrada pela realização de vários ensaios clínicos. Este fármaco conduz, não só, a melhorias nos sinais e sintomas da AR ativa, mas também abranda ou interrompe a progressão dos danos articulares, observada por raios-X ¹⁸¹⁻¹⁸². Além disso, esta terapia conduz a uma redução significativa das concentrações de FR ¹⁸³⁻¹⁸⁵.

O tratamento com AKR revelou um abrandamento da progressão radiológica característica da AR e melhorias significativas nos sinais e sintomas da patologia ¹⁸⁶⁻¹⁸⁷.

O ABT tem-se mostrado eficiente no tratamento dos sintomas clínicos da AR e no impedimento da progressão radiográfica dos danos articulares ¹⁸⁸.

3.7 Segurança e Imunotoxicidade

Os fármacos biológicos têm sido amplamente aplicados no tratamento da AR e como consequência apresentam um perfil de segurança bem estabelecido e caracterizado ¹⁶³.

O conceito de imunotoxicidade compreende quatro aspetos distintos, a imunossupressão, a imunoestimulação ou imunoativação, a hipersensibilidade e a autoimunidade, tendo em conta os efeitos imunotóxicos e as consequências clínicas adversas associadas ¹⁸⁹.

O elevado potencial imunotóxico da terapêutica biológica está relacionado com uma combinação de diversos fatores entre os quais: a natureza da molécula, embora cada vez mais humanizadas; as moléculas de elevado peso molecular e não-endógenas são normalmente reconhecidas como estranhas pelo sistema imunitário; o mecanismo de ação e alvo terapêutico envolve um componente-chave ou uma via do sistema imunitário; e as características do doente, frequentemente imunodeprimidos e/ou com condição imunopatológica subjacente ¹⁸⁹.

As reações adversas relacionadas com a imunossupressão e a autoimunidade são as mais comuns com a terapêutica biológica ¹⁸⁹⁻¹⁹⁰.

A imunossupressão está associada ao aparecimento de complicações infecciosas (oportunistas ou atípicas) e, como menos frequência, a neoplasias de origem viral ¹⁸⁹. As infecções são efeitos secundários potencialmente graves de qualquer medicamento que modifica as respostas imunes, e as infecções bacterianas e virais continuam a ser uma fonte de preocupação em doentes tratados com agentes inibidores do TNF- α na AR ¹⁹⁰⁻¹⁹¹.

As complicações infecciosas associadas à terapêutica anti-TNF- α incluem novas infecções (oportunistas), agravamento de infecções existentes ou reativação de infecções latentes. São conhecidos casos de infecções bacterianas (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus*, *Nocardia*, *Salmonella*, *Brucella* e *Bartonella*), infecções fúngicas (*Histoplasma capsulatum*, *Candida* e *Aspergillus fumigatus*), infecções protozoárias (*Toxoplasma*) e infecções virais (*Citomegalovirus*, *Herpes zoster*, *Parainfluenza*, *Adenovirus* e *Paramixovirus* e *Ortomixovirus*). A infecção por *Mycobacterium tuberculosis* é a mais frequentemente documentada ¹⁹²⁻¹⁹⁴. De particular interesse são vários estudos que descrevem a reativação de infecções latentes de *Mycobacterium tuberculosis* ¹⁶³. A possível reativação de tuberculose (TB) latente tem sido descrita desde a comercialização de fármacos inibidores do TNF- α , onde mais de 50% dos casos descritos envolveram infecções extra-pulmonares, a maior parte deles têm ocorrido na Europa, em doente com uma história conhecida de TB ¹⁹⁵. Como o TNF- α desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra *M. tuberculosis*, tais observações clínicas têm levado à introdução da triagem de TB antes do início do tratamento ¹⁹¹.

Os inibidores do TNF- α também têm sido associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistémico, síndrome do tipo lúpus, vasculite cutânea, doença pulmonar intersticial, e doença de Behcet ¹⁹⁶⁻¹⁹⁷.

Os efeitos adversos mais frequentes no tratamento com o RTX são reações de infusão, que são observadas em 30 a 45% dos doentes na primeira infusão, mas menos frequente em doses subsequentes ¹⁸⁴. Este fármaco está também associado a infecções bacterianas e fúngicas, que são observadas em menos de 30% dos doentes tratados com o RTX, mas infecções severas e oportunistas, como o caso de TB observada nos doentes tratados com inibidores do TNF- α , são raras ¹⁹⁸. Contudo, o RTX foi associado ao desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva, consequência de complicações infecciosas em doentes com lúpus eritematoso ¹⁶³.

Devido ao facto do alvo desta terapia ser direccionado apenas para linfócitos B que expressam CD20 e como consequência não levar a eliminação de plasmócitos, a maior parte dos doentes tratados com o RTX apresentam níveis de imunoglobulinas normais. No entanto, as alterações mais evidentes são observadas com o subtipo IgM, onde cerca de 25% dos doentes apresentam níveis baixos desta imunoglobulina ¹⁸³.

Os efeitos adversos mais frequentemente relatados com o uso do TCZ apresentam uma leve a moderada e incluem infecções do trato respiratório, nasofaringites, cefaleias e hipertensão.

Este fármaco leva ao aumento das concentrações de colesterol e triglicéridos ¹⁹⁹. No entanto, um estudo identificou também a supressão marcada do número de neutrófilos no sangue periférico de doentes com AR, um dia após a administração de TCZ. A neutropenia pode predispor ao desenvolvimento de infeções, pois esta representa um fator de risco adicional a um estado imunodeprimido subjacente ²⁰⁰.

A AKR é razoavelmente bem tolerada, com reações de infusão sendo os efeitos adversos mais comuns, ocorrendo em, até 70% dos doentes ²⁰¹⁻²⁰². Estas reações não necessitam de tratamento e pode diminuir com o uso continuado. Um aumento da incidência de infeções graves foi também observado no tratamento com este fármaco ²⁰³.

O ABT apresenta um perfil de segurança semelhante ao dos outros fármacos biotecnológicos, sendo que os efeitos adversos compreendem reações de infusão e um risco aumentado de infeções ^{174,204}.

3.8 Imunogenicidade

A administração de agentes biológicos, tais como fármacos anti-TNF- α e outros fármacos, pode levar à formação de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, como tem sido demonstrado em vários estudos ²⁰⁵⁻²⁰⁶.

A imunogenicidade dos antagonistas do TNF- α tem sido amplamente investigada devido às suas possíveis repercussões sobre a eficácia e segurança terapêuticas. Os vários inibidores apresentam diferente imunogenicidade, que é influenciada por fatores como a via de administração, medicação concomitante, a dose e plano de tratamento, genética, idade e sexo, estado imunológico e nutricional, características da doença, o tamanho e a estrutura do fármaco, o número de epítomos, a taxa de depuração de complexos imunes e a solubilidade do fármaco ²⁰⁵. Os mecanismos que conduzem à formação de anticorpos antifármaco e auto-anticorpos, e que agora não ser descritos, são apresentados na figura 18.

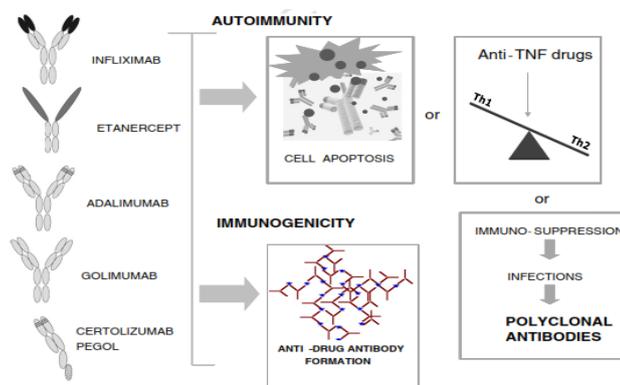


Figura 18. Mecanismos de autoimunidade e de imunogenicidade associados aos antagonistas do TNF- α (Adaptado de Atzeni et al., 2012 ¹⁹⁰).

Ensaio clínicos randomizados mostraram que 25 a 40% dos doentes com doença inflamatória do intestino desenvolvem resistência ou reações adversas a agentes anti-TNF- α , provavelmente por causa de anticorpos neutralizantes^{205,207}. Dado que o IFX e o ETA têm sido utilizados durante mais tempo, a sua imunogenicidade está melhor caracterizada do que a dos outros agentes. Além disso, a estrutura quimérica, a dose, via de administração, e frequência de administração de IFX aumentam a sua imunogenicidade²⁰⁵.

As diferenças estruturais observadas entre os agentes anti-TNF- α afetam a sua imunogenicidade, mas o desenvolvimento de anticorpos antifármaco também pode ser influenciado por uma infeção concomitante²⁰⁸⁻²⁰⁹.

Tem sido relatado que os doentes com AR e de doença de Crohn que são tratados com inibidores seletivos do TNF- α desenvolvem auto-anticorpos, tais como ANA, anticorpos anti-dsDNA e anti-fosfolípidos (aPL)^{190,209}.

Os anticorpos antifármaco podem impedir a resposta clínica e a atividade de controlo das doenças, afetando a biodisponibilidade do fármaco, farmacocinética e farmacodinâmica²⁰⁹⁻²¹⁰. No entanto, em alguns casos, a eficácia clínica dos inibidores do TNF- α pode não ser afetada pela presença de anticorpos antifármaco, provavelmente porque têm baixa afinidade para o fármaco ou não interagem com ele, ou porque o tratamento concomitante com fármacos imunossupressores, tais como a azatioprina ou o MTX, pode diminuir a formação destes anticorpos, no entanto, o mecanismo exato não é conhecido^{206,210}.

O IFX induz a secreção de anticorpos anti-quiméricos humanos²⁰⁶⁻²⁰⁷. A prevalência de anticorpos anti-IFX varia de 12% a 44% em doentes com AR, e de 6% a 61% em doentes com doença de Crohn²¹¹.

Os anticorpos anti-ETA não neutralizantes foram detetados em alguns doentes²⁰⁸⁻²⁰⁹. Klareskog e os seus colaboradores avaliaram recentemente a segurança a longo prazo e eficácia do ETA com e sem terapia com DMARDs concomitantes em doentes com AR, e descobriram que a relação entre os níveis de auto-anticorpos e os eventos clínicos não era estatisticamente significativa²¹². Além disso, menos de 5% dos doentes eram positivos para anticorpos anti-ETA anticorpos, os quais eram não-neutralizantes¹⁹⁰.

Alguns doentes desenvolvem anticorpos anti-idiotípo ADA-específicos, que foram observados em 12% dos doentes em ensaios clínicos em monoterapia com o ADA e em 1% doentes que receberam a terapia combinada com o MTX²⁰⁹. Estes anticorpos foram encontrados em 6 a 87% dos doentes com AR²⁰⁹.

No entanto, o desenvolvimento de anticorpos contra o IFX, o ETA ou o ADA não está relacionado com uma diminuição na eficácia e a uma interrupção precoce do tratamento²¹³. Isto sugere que a correlação entre a presença de anticorpos antifármaco e as respostas clínicas ou reações de infusão dependem do tipo de anticorpo (IgG, IgM ou IgA)¹⁹⁰.

Thurlings e os seus colaboradores investigaram a prevalência de anticorpos anti-RTX e a sua relevância clínica para a efetividade da terapêutica com o fármaco em doentes com AR. Estes investigadores associaram a presença de anticorpos antifármaco (8,6% dos doentes) aos níveis mínimos de RTX ²¹⁴.

Aproximadamente 12% dos doentes com doença de Crohn tratados com CTZ desenvolvem anticorpos antifármaco ²⁰⁷. O impacto clínico destes anticorpos permanece desconhecido ¹⁹⁰. Vários estudos têm mostrado que o IFX levou ao desenvolvimento de ANA em 29 a 76,7% e anticorpos anti-dsDNA em 10 a 29% dos doentes que participam em ensaios clínicos. Doentes tratados com ETA revelaram uma prevalência de ANA e anticorpos anti-dsDNA de 11 a 36% e 5 a 15%, respetivamente. No caso dos doentes tratados com ADA, os resultados revelaram uma prevalência de ANA e anticorpos anti-dsDNA de 12,9% e de 5,3%, respetivamente ²⁰⁹.

3.9 Monitorização da terapêutica

Devido aos elevados custos, entre 12000 e 18000 euros por ano e por doente ²¹⁵, e aos efeitos adversos significativos da terapêutica com fármacos biológicos, torna-se particularmente importante efetuar uma eficiente monitorização da terapêutica. Sabe-se que cerca de 30 a 40% dos doentes submetidos a esta terapia com antagonistas do TNF- α , entram em falha terapêutica ¹⁶³. Ao longo dos últimos anos, muitos grupos de investigação tem centrado o seu interesse em tentar encontrar biomarcadores de valor predito para prever a falha de terapêutica destes agentes ou a necessidade de trocar para outro fármaco biológico. Estes estudos têm sido realizados em duas vertentes, uma na pesquisa de marcadores no pré-tratamento que permitam avaliar se o doente é candidato a esta terapia, e outra na pesquisa de marcadores durante o tratamento que permitam antecipar a falha da terapêutica.

Os parâmetros classicamente usados para monitorizar a terapêutica, DAS28, HAQ, ACR20, 50, 70 e 90, CRP e VS, apresentam grandes limitações, nomeadamente devido à subjetividade de algumas avaliações e a variações observadas entre os doentes ³².

Assim, nos últimos anos, vários parâmetros têm sido estudados a fim de verificar a sua aplicabilidade e o seu valor preditivo para monitorizar a terapêutica biológica.

3.9.1 Quantificação dos níveis séricos de fármaco e de anticorpos antifármaco

Vários investigadores têm defendido que a avaliação dos níveis séricos de fármaco e dos níveis séricos de anticorpos antifármaco são uma ferramenta essencial para a monitorização dos doentes que se encontram a realizar terapia biológica ²¹⁶. No entanto, questões controversas continuam a ser suscitadas acerca do significado clínico destes parâmetros e a sua aplicação não está totalmente estabelecida.

Existem várias evidências que suportam a importância da quantificação dos níveis séricos de fármaco e de anticorpos antifármaco ²¹⁶. Em primeiro lugar, a farmacocinética dos antagonistas do TNF- α apresenta variabilidade inter-individual considerável, isto é, a mesma dose de IFX baseada no peso produz níveis séricos de IFX substancialmente diferentes ²¹⁷. Esta variabilidade é provavelmente atribuível à diversidade de características do doente (em relação a fisiologia e ao *background* genético), às características da doença (a gravidade da inflamação e mecanismos fisiopatológicos), e ao uso fármacos concomitantes (MTX) ²¹⁸. Numa determinada dose de IFX, as concentrações séricas mínimas variaram amplamente entre os doentes. Variabilidades inter-individuais semelhantes na farmacocinética de inibidores do TNF- α têm sido observadas com o ADA e o ETA ²¹⁹⁻²²⁰. Em segundo lugar, os efeitos de um agente anti-TNF- α dependem da sua concentração. Estudos publicados desde 2002 mostraram que a taxa de resposta clínica aumenta com a concentração IFX ^{217,221}. Subsequentemente, foram obtidos resultados semelhantes com o ADA e o ETA ²²²⁻²²⁴. Em último lugar, estes agentes biológicos são imunogénicos. A taxa de formação de anticorpos antifármaco variou entre estudos, mas foi mais elevada com os anticorpos monoclonais contra o TNF- α , independentemente do grau de humanização dos domínios variáveis ²¹⁶. O desenvolvimento destes anticorpos está associado com a diminuição da eficácia terapêutica e, em muitos casos, com a ocorrência de eventos adversos imuno-alérgicos ^{222,225}. Estudos de farmacocinética revelaram que a formação de anticorpos antifármaco conduziu a um decréscimo acentuado no tempo de semivida do fármaco ²²⁶⁻²²⁷. A evidência sugere que a exposição inicial a baixas concentrações de fármaco pode estar associada a um maior risco de desenvolvimento destes anticorpos, em relação à exposição a concentrações mais elevadas ²²⁸⁻²²⁹. Ao ajustar a dose, o risco de imunização com doses baixas deve ser tido em conta, embora o *cut-off*, abaixo do qual a imunização é mais provável, permaneça desconhecido e possa variar entre doentes e os biofármacos ²¹⁶.

3.9.2 Quantificação dos níveis de metaloproteinasas

Na AR, a destruição progressiva da cartilagem e de outros componentes do tecido conetivo é mediada cooperativamente por catepsinas e MMPs e ocorre um desequilíbrio dos níveis de MMP e TIMPs ²³⁰. As MMPs são produzidas por fibroblastos sinoviais, condrócitos e monócitos em resposta à presença de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , e de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento derivado das plaquetas ²³¹.

As MMP formam uma família de enzimas estruturalmente e funcionalmente relacionadas, que podem ser subdivididas em cinco grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP -9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), um grupo heterogéneo contendo matrilisina (MMP-7), enamelisina (MMP-20) e metaloelastases de macrófagos (MMP-12, MMP-19) e um grupo de enzimas de membrana (MT1-MMP a MT6-MMP). Estes mediadores são expressos por células de cartilagem articular e da membrana sinovial, bem como por

osteoclastos²³⁰. As atividades enzimáticas das MMPs são estritamente controladas por inibição com inibidores específicos, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4²³².

Na AR, os fibroblastos sinoviais produzem principalmente MMP-1, 3, 9, 10 e 13²³³.

A MMP-1, também conhecida por colagenase, e a MMP-3, também conhecida por estromelina-1, são as enzimas mais importantes envolvidas na destruição articular observada na AR²³⁴. A MMP-1 degrada o colagénio tipo II e a MMP-3 degrada uma variada gama de proteínas da matriz, incluindo PG, laminina e fibronectina e colagénio tipo IV, VII, IX e XI²³⁴. Esta última tem ainda a capacidade de ativar outras MMPs, como a MMP-2 e 9²³⁵.

Estudos revelaram que os níveis de MMP-1 e de MMP-3 encontram-se aumentados no líquido sinovial de doentes com AR²³⁶⁻²³⁷, e que os níveis séricos de MMP-3 estão correlacionados com os níveis de MMP-3 produzidos na membrana sinovial, e que estes refletem o nível de atividade da sinovite reumatoide. A MMP-3 é um marcador sistémico, que reflete a inflamação articular local e pode ser um marcador de inflamação específico da membrana sinovial²³⁸.

Estudos adicionais demonstraram que os níveis séricos de MMP-3 diminuem em doentes com resposta clínica a DMARDs²³⁹⁻²⁴⁰.

Brennan e os seus colaboradores avaliaram os níveis de MMP-1 e MMP-2 em doentes com AR, submetidos a um tratamento de curta duração com um antagonista do TNF- α . O estudo revelou que este agente provoca uma diminuição significativa e mantida dos níveis séricos de MMP-3 e, em menor extensão, de MMP-1. Este estudo confirma resultados obtidos anteriormente em doentes com AR, onde os níveis de MMP-3 são elevados e correlacionam-se com as medidas de inflamação da doença, e além disso, demonstra que os níveis séricos de MMP-3 e de MMP-1 são regulados negativamente por antagonistas do TNF- α . Embora os níveis séricos de MMP-3 estejam correlacionados com os níveis de CRP antes e após o tratamento, ainda não foi demonstrado que os níveis de MMP-3 e/ou MMP-1 refletem os processos de reabsorção da cartilagem e do osso²³⁴.

Durez e os seus colegas observaram que os níveis de MMP-3 diminuem significativamente em doentes com AR após 6 semanas de tratamento com IFX²⁴¹.

A MMP-9 é uma enzima que degrada componentes da matriz extracelular, como o colagénio tipo IV, fibronectina e vitronectina e é um mediador inflamatório envolvido no desenvolvimento de eventos cardiovasculares²⁴². A sua expressão encontra-se aumentada na membrana sinovial e os níveis séricos e sinoviais encontram-se elevados em doentes com AR²³². Kotani e os seus colaboradores investigaram o efeito do IFX nos níveis séricos de MMP-9 em doentes com AR. Este grupo de estudo observou que os níveis de MMP-9 eram mais elevados em doentes com a doença ativa e que o IFX provocou uma redução significativa dos níveis deste mediador²⁴³.

3.9.3 Outros parâmetros

Outros parâmetros têm sido propostos para a monitorização da terapêutica biológica.

Koga e os seus colegas avaliaram o recetor ativador da plaminogénio-urocinase solúvel (uPAR) como biomarcador de valor preditivo da resposta ao ADA. Avaliaram também o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e o VEGF. Este grupo de investigação registou uma diminuição significativa do MIF, VEGF e uPAR nos doentes que responderam positivamente ao tratamento, o que não se observou nos doentes não responsivos ao tratamento. Além disso, os níveis de uPAR na linha base do tratamento eram significativamente mais elevados nos doentes que não responderam à terapia. Os autores concluíram, assim, que o uPAR pode ser um biomarcador preditivo de falha primária do tratamento com o ADA em doentes com AR ²⁴⁴.

Em 2012, Matsuyama e os seus colegas avaliaram os níveis séricos de IL-33, seis meses após o tratamento com IFX ou ETA e concluíram que estes diminuíram significativamente nos doentes respondedores, enquanto que nos doentes não respondedores ao tratamento não se alteraram. A elevação sustentada dos níveis séricos e/ ou sinoviais de IL-33 pode ser responsável pela fraca resposta a inibidores do TNF- α , embora o mecanismo através do qual os inibidores do TNF- α afetam os níveis de IL-33 permaneça desconhecido ²⁴⁵.

Bobbio-Pallavicini e os seus colegas avaliaram os níveis de FR e anticorpos anti-CCP em doentes com AR, sob terapêutica biológica com o IFX, ou o ADA ou o ETA e observaram que, de acordo com a resposta clínica, os antagonistas do TNF- α parecem reduzir os níveis do FR IgA, IgM e IgG. Além disso, os investigadores concluíram também que os níveis elevados de FR IgA, no pré-tratamento, estão associados a uma fraca resposta clínica aos inibidores de TNF- α ²⁴⁶.

Tem-se observado o desenvolvimento de anticorpos aCL durante o tratamento com inibidores do TNF- α . Jonsdottir associou o aumento da prevalência destes anticorpos em doentes com AR que se encontram a realizar terapêutica biológica com o IFX e o ETA. Este estudo permitiu também concluir que o desenvolvimento de anticorpos aCL durante o tratamento com IFX está associado aos piores resultados clínicos, mas não se observou o mesmo com o ETA ²⁴⁷.

Como foi demonstrado, nos últimos anos várias ferramentas têm emergido para monitorizar a terapêutica biológica. Contudo, na prática clínica diária a monitorização da terapia continua a ser subvalorizada e provavelmente devido à ausência de padrões para a efetuar eficiente e rentavelmente na rotina laboratorial.

II. Objetivos

Este projeto de investigação consistiu num estudo retrospectivo desde o ano de 2008, até ao presente ano e a amostra inicial incluiu todos os doentes com Artrite Reumatoide (AR), seguidos nas consultas das doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda (CDAI-ULSG). O presente trabalho teve como objetivo analisar o impacto da terapêutica com agentes biológicos no *Disease Activity Score* (DAS28) e em diferentes parâmetros laboratoriais em doentes com AR.

Consequentemente, partindo de uma população de doentes com AR, seguidos nas CDAI-ULSG, que se encontram ou encontraram submetidos a terapêutica biológica e de um grupo de controlo constituído por doentes com AR, não submetidos a agentes biológicos, delinearam-se os seguintes objetivos:

1. Caracterizar a população do ponto de vista da história clínica, especialmente no que se refere ao DAS28 e evolução da doença, idade, sexo, tempo do diagnóstico, terapêutica em uso e suas alterações, caso existam;
2. Analisar aos dados referentes ao parâmetro clínico DAS28;
3. Analisar aos dados referentes aos níveis serológicos de parâmetros hematológicos: contagem de leucócitos, contagem de eritrócitos e cálculo dos respetivos índices hematológicos e contagem de plaquetas;
4. Analisar aos dados referentes aos níveis serológicos de parâmetros imunológicos: anticorpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP), anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV), fator reumatoide (FR), FR IgA e FR IgM e marcadores da resposta de fase aguda, velocidade de sedimentação (VS) e proteína C reativa (CRP);
5. Correlacionar os dados laboratoriais com o DAS28 e com a terapêutica realizada;
6. Analisar os perfis de evolução da doença para cada doente;
7. Correlacionar parâmetros laboratoriais com o DAS28.

III. Material e Métodos

1. Seleção da amostra

A amostra inicial incluiu todos os doentes com Artrite Reumatoide (AR), seguidos nas consultas das doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda (CDAI-ULSG).

Após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética da Unidade Local de Saúde da Guarda, os processos clínicos dos doentes com AR foram consultados e revistos. Para cada doente foi recolhida informação sobre a informação demográfica (idade e género), medicação utilizada (início, duração e tipo de tratamento), *Disease Activity Score* (DAS28), e outras informações, como a presença de patologias secundárias e efeitos adversos.

Foram selecionados um total de 25 doentes e estes foram separados em dois grupos, um grupo de controlo, constituído por 14 doentes com AR que não se encontravam a efetuar terapêutica biológica, e um grupo de estudo constituído por 11 doentes com histórico de prescrição de fármacos biológicos. A ausência de dados clínicos, levou à exclusão prévia de alguns doentes deste estudo.

2. Parâmetros analisados

Os parâmetros selecionados para análise incluíram todos os que são habitualmente utilizados na monitorização clínica da AR e resultados terapêuticos. Desta forma, procedeu-se à análise de parâmetros hematológicos e imunológicos.

2.1 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos, contagem de leucócitos, contagem de eritrócitos e cálculo dos respetivos índices hematológicos e contagem de plaquetas, foram analisados por citometria de fluxo.

A velocidade de sedimentação (VS) foi obtida pelo método de Westergren modificado.

2.2 Parâmetros imunológicos

A Proteína C reactiva (CRP) foi determinada por turbidimetria.

O fator reumatoide (FR) foi determinado por turbidimetria.

Os anticorpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP), anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV) e FR IgA e IgM foram determinados por imunoenaios fluoroenzimáticos (FEIA).

3. Análise dos resultados

Os dados recolhidos foram tratados no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.

De modo a seleccionar corretamente o teste estatístico apropriado para efetuar à análise comparativa entre os dois grupos definidos, procedeu-se à verificação da normalidade das variáveis, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Shapiro & Wilk, e da homogeneidade das variâncias, recorrendo ao teste de Levene.

Assim, de acordo com as normas estatísticas, quando se verificam simultaneamente os dois pressupostos anteriores, a análise comparativa entre dois grupos é realizada comparando os valores médios das variáveis quantitativas, recorrendo ao teste *t*-Student. Caso um dos pressupostos não seja verificado, a análise comparativa entre dois grupos deve ser efetuada com o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, recorrendo às medianas das variáveis.

Para efetuar uma análise comparativa entre mais de dois grupos, nos quais se verifiquem simultaneamente os dois pressupostos anteriormente descritos, recorre-se ao teste One-Way-Anova, que compara as médias das variáveis entre os diferentes grupos, simultaneamente.

IV. Resultados

1. Caracterização da amostra

O presente estudo clínico retrospectivo incluiu dados clínicos e laboratoriais desde o ano de 2008 até ao presente ano dos doentes com artrite reumatoide (AR) acompanhados nas consultas das doenças Autoimunes da Unidade Local de Saúde da Guarda (CDAI-ULSG). Para a realização deste estudo, foram envolvidos um total de 25 doentes com AR, que foram separados em dois grupos: um grupo de estudo, constituído por 11 doentes que efetuaram tratamento com fármacos biológicos, e um grupo de controlo, constituído por 14 doentes que não efetuaram terapêutica biológica. As características demográficas dos doentes envolvidos neste estudo são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Características demográficas dos 25 doentes com AR envolvidos no estudo.

	Grupo de Controlo (n = 14)	Grupo de Estudo (n = 11)
Idade (anos)	65,5 ± 15,1	54,9 ± 18,0
Sexo feminino	12 (85,7%)	11 (100%)

No grupo de estudo, todos os doentes envolvidos eram do sexo feminino, com idades entre os 20 e os 81 anos (média = 54,9 anos ± 18,0). No grupo de controlo, a amostra incluiu maioritariamente doentes do sexo feminino (85,7%), com idades compreendidas entre 31 e os 83 anos (média = 65,5 anos ± 15,1).

Devido à ausência de registos clínicos, na maioria dos casos não foi possível averiguar a idade de diagnóstico da patologia e conseqüentemente o tempo de duração da mesma.

2. Caracterização do perfil farmacoterapêutico

O perfil farmacoterapêutico dos doentes envolvidos neste estudo é apresentado na tabela 5. Os dados apresentados não refletem o tratamento efectuado à data da consulta dos processos clínicos, mas sim, os fármacos prescritos ao longo dos últimos 5 anos em que os doentes foram acompanhados nas CDAI-ULSG.

Ao nível do tratamento convencional, observou-se que a terapêutica sintomática com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) era usada em 81,8% e 57,1% e a corticoterapia era aplicada em 54,5% e 92,9% dos doentes do grupo de estudo e do grupo de controlo respetivamente. O etorixcoxib foi o AINE mais prescrito em ambos os grupos e a prednisolona

o corticosteroide mais prescrito nos dois grupos. Na maioria dos casos, a terapêutica sintomática foi feita com combinação de AINEs e corticoterapia.

A prescrição de fármacos antirreumáticos modificadores da evolução da doença (DMARDs) clássicos foi observada em 63,6% e 100% dos doentes do grupo de estudo e do grupo de controlo, respetivamente, sendo que no grupo de estudo o MTX foi o fármaco deste tipo mais prescrito (36,4%), enquanto que no grupo de controlo se registou igual prescrição de MTX e hidroxicloroquina (64,3%). Nos restantes doentes de ambos os grupos não se registou a prescrição de DMARDs, devido à ocorrência de eventos adversos, como hepatotoxicidade, ou por contra-indicação.

Tabela 5. Perfil farmacoterapêutico dos 25 doentes com AR envolvidos no estudo.

	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo	
Tratamento				
AINEs	8	(57,1%)	9	(81,8%)
Celecoxib	2	(14,3%)	2	(18,2%)
Naproxeno	0	(0,0%)	1	(9,1%)
Etorixcoxib	7	(50,0%)	4	(36,4%)
Meloxicam	0	(0,0%)	3	(27,3%)
Corticosteroide	13	(92,9%)	6	(54,5%)
Prednisolona	9	(64,3%)	4	(36,4%)
Metilprednisolona	1	(7,1%)	0	(0,0%)
Deflazacorte	5	(35,7%)	2	(18,2%)
DMARDs clássicos	14	(100%)	7	(63,6%)
MTX	9	(64,3%)	4	(36,4%)
Hidroxicloroquina	9	(64,3%)	3	(27,3%)

O historial de terapêutica biológica é apresentado na tabela 6. Através da análise dos dados recolhidos, verificou-se que os antagonistas do TNF- α constituem a primeira linha de escolha, por parte dos clínicos. Deste tipo de agentes biológicos, como primeira linha de tratamento, o adalimumab (ADA) foi prescrito a 54,5% dos doentes, o etanercept (ETA) a 27,3% e o golimumab (GOL) e infliximab (IFX) a 9,1% dos doentes. Na presente amostra, verificou-se que em 7 doentes (63,6%) houve substituição do primeiro fármaco por um segundo agente biológico e num doente por um terceiro e quarto fármacos.

Não foi possível verificar em todos os doentes a administração de MTX em associação com o fármaco biológico, pela falta de registos clínicos.

Os motivos que levaram à decisão clínica de substituir o fármaco biológico nestes doentes foram variados, sendo que o agravamento da sintomatologia foi o principal. No entanto, em alguns casos, a mudança de agente biológico ocorreu devido à ocorrência de eventos

secundários, como infeções e reações de infusão ou ao agravamento de patologias secundárias.

Tabela 6. Alterações à terapêutica biológica nos 11 doentes com AR.

Fármaco Biológico	1ª Linha		2ª Linha		3ª Linha		4ª Linha	
Adalimumab	6	(54,5%)	1	(9,1%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
Golimumab	1	(9,1%)	1	(9,1%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
Etanercept	3	(27,3%)	3	(27,3%)	0	(0,0%)	1	(9,1%)
Infliximab	1	(9,1%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
Rituximab	0	(0,0%)	1	(9,1%)	1	(9,1%)	0	(0,0%)
Tocilizumab	0	(0,0%)	1	(9,1%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
Não substituiu	2	(18,2%)	5	(45,5%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
Descontinuou	2	(18,2%)	1	(9,1%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)

3. Análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais

Para avaliar a eficácia clínica do tratamento com fármacos convencionais e do tratamento com agentes biológicos, procedeu-se à recolha dos dados clínicos referentes ao *Disease Activity Score* (DAS28) e dos dados laboratoriais dos doentes envolvidos no estudo, de forma a efetuar um estudo comparativo entre os grupos anteriormente referidos e caracterizados. O número de doentes analisados (n) varia com o parâmetro a analisar.

3.1 Parâmetro clínico

Como descrito anteriormente no capítulo referente à metodologia, procedeu-se à verificação da normalidade das variáveis e da homogeneidade das variâncias. Assim, de acordo com as normas estatísticas, o DAS28 foi analisado pelo teste *t*-Student. A análise comparativa do DAS28 entre o grupo de controlo e o grupo de estudo é apresentada na tabela 7.

Tabela 7. Valores médios de DAS28 e respetivos desvios padrão para o grupo de controlo e para o grupo de estudo.

Parâmetro	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo	
	n	Média ± SD	n	Média ± SD
DAS28	14	3,22±1,03	10	3,83±0,98

Na comparação do DAS28 entre os dois grupos analisados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

3.2 Parâmetros hematológicos

A nível estatístico, procedeu-se da forma previamente descrita. Assim, a contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eritrócitos, quantificação da hemoglobina, os índices hematimétricos hematócrito, hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), índice de distribuição dos eritrócitos (RDW), contagem de plaquetas e velocidade de sedimentação (VS) foram analisados pelo teste *t*-Student, enquanto que o número de eosinófilos e basófilos e o volume corpuscular médio (MCV) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon.

A análise comparativa dos parâmetros hematológicos entre o grupo de controlo e o grupo de estudo é apresentada nas tabelas 8 e 9, acompanhada dos valores de referência.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros hematológicos e respetivos desvios padrão para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, analisados pelo teste *t*-Student e correspondentes valores de referência.

Parâmetro	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo		Valores de Referência Mínimo - Máximo
	n	Média ± SD	n	Média ± SD	
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)*	14	7,25±1,12	10	6,11±1,19	3,04-8,54
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)*	14	4,60±1,15	10	3,26±0,84	1,57-5,78
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14	2,01±0,58	10	2,28±0,63	0,99-2,90
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14	0,49±0,11	10	0,42±0,11	0,15-0,47
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	14	4,45±0,25	10	4,45±0,31	3,78-4,99
Hemoglobina (g/dL)	14	13,14±0,98	10	12,87±1,01	10,8-14,9
Hematócrito (%)	14	40,34±2,32	10	39,13±3,01	35,6-45,4
MCH (pg)	14	29,70±1,79	10	28,73±1,59	26,8-33,2
MCHC (g/dL)	14	32,69±0,84	10	32,89±0,80	30,7-34,0
RDW (%)	14	14,00±1,07	10	13,83±0,80	11,9-14,5
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14	240,01±55,33	10	225,74±45,18	150-361
VS (mm)	14	30,46±19,86	10	38,30±20,60	2-20

* Estatisticamente significativo ao nível de 5%.

Tabela 9. Mediana, máximos e mínimos dos parâmetros hematológicos para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, analisados pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon e correspondentes valores de referência.

Parâmetro	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo		Valores de Referência Mínimo-Máximo
	n	Mediana (mínimo-máximo)	n	Mediana (mínimo, máximo)	
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14	0,11 (0,06-0,29)	10	0,13 (0,06-0,6)	0,02-0,38
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	14	0,02 (0,01-0,09)	10	0,02 (0,01-0,03)	0,01-0,09
MCV (fL)*	14	91,38 (80,75-96,4)	10	89,13 (79,35-92)	85,0-101,0

* Estatisticamente significativo ao nível de 5%.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo e o grupo de estudo no valor de leucócitos e neutrófilos e no índice hematimétrico MCV. Para os restantes parâmetros, não se registaram diferenças estatisticamente significativas. Salienta-se ainda que os valores médios da maioria dos parâmetros se encontram dentro dos intervalos de referência definidos para cada parâmetro. Neste contexto, o valor médio da VS destaca-se, pois encontra-se aumentado nos dois grupos em relação aos valores de referência.

Para os parâmetros nos quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, efetuou-se uma representação gráfica, de forma a permitir uma melhor visualização dos resultados. A comparação dos valores médios da contagem de leucócitos e neutrófilos entre os dois grupos analisados e apresentada no gráfico 1. O gráfico 2 mostra a mediana, valores máximos e mínimos do MCV para ambos os grupos.

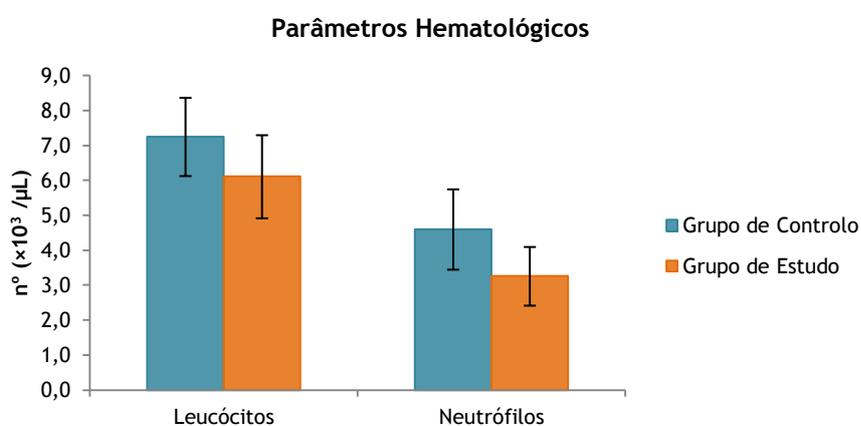


Gráfico 1. Comparação dos valores médios e respetivos desvios padrão da contagem de leucócitos e neutrófilos no grupo de controlo e no grupo de estudo.

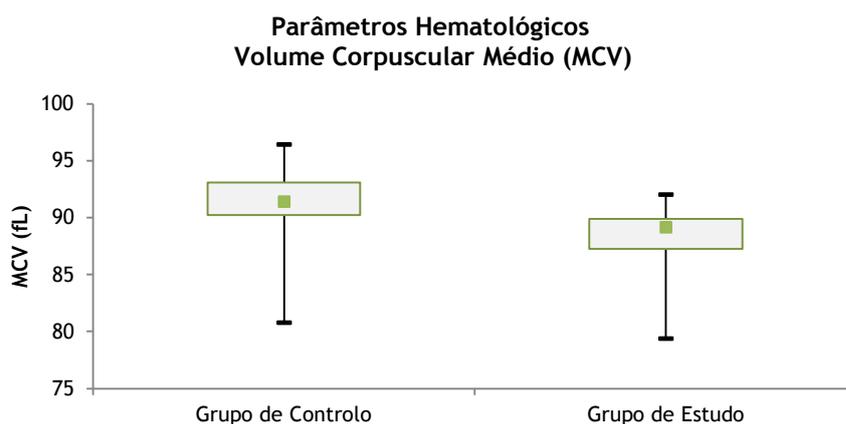


Gráfico 2. Comparação das medianas, máximos e mínimos dos valores de MCV no grupo de controlo e no grupo de estudo.

3.3 Parâmetros imunológicos

A nível estatístico, procedeu-se da forma anteriormente descrita. Assim sendo, todos os parâmetros apresentados neste subcapítulo, fator reumatoide (FR), FR IgA e IgG, anticorpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP) e anticorpos anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Não foi possível analisar os valores de proteína C reativa (CRP), imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) e fatores do complemento (C3 e C4) uma vez que os registos destes parâmetros imunológicos eram quase inexistentes nos processos clínicos.

A análise comparativa dos parâmetros imunológicos entre o grupo de controlo e o grupo de estudo é apresentada na tabela 10, acompanhada dos valores de referência definidos para cada parâmetro.

Tabela 10. Mediana, máximos e mínimos dos parâmetros imunológicos para o grupo de controlo e para o grupo de estudo e correspondentes valores de referência.

Parâmetro	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo		Valores de Referência
	n	Mediana (mínimo-máximo)	n	Mediana (mínimo-máximo)	
FR (UI/mL)	14	26,05 (16-499)	10	58,18 (12-586,5)	< 50
FR IgA (UI/mL)	12	16,75 (2,85-350)	8	20 (4,45-99)	Negativo < 14 Duvidoso 14-20 Positivo > 20
FR IgM (UI/mL)	12	21 (1,65-2410)	8	13 (1,3-96,5)	Negativo < 3,5 Duvidoso 3,5-5,0 Positivo > 5,0
Anticorpos anti-CCP (U/mL)	14	180,5 (33-1640)	8	322,25 (2-3765)	Negativo < 7 Duvidoso 7-10 Positivo > 10
Anticorpos anti-MCV (U/mL)	12	239,5 (10,18-778,5)	10	51,18 (7,56-1580)	< 20

Nos parâmetros investigados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos analisados.

4. Análise dos perfis de evolução do tratamento

Recorrendo às várias determinações dos parâmetros laboratoriais e do DAS28, disponíveis nos processos clínicos dos doentes, pretendeu-se entender e avaliar a evolução desses parâmetros ao longo do tempo, para cada doente de ambos os grupos.

Assim, procedeu-se a este estudo para o DAS28, e para os parâmetros hematológicos VS, contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Não foi possível efetuar esta análise para os parâmetros imunológicos devido ao escasso número de determinações disponíveis nos processos clínicos dos doentes.

Os resultados desta análise são apresentados em forma de gráficos parâmetro em função do tempo. Uma vez que cada doente apresentava quantificações em tempos diferentes, este foi esquematicamente representado (de 1 a x), de forma a permitir uma melhor visualização e comparação dos perfis entre os doentes. Exemplo, o doente N apresenta 13 quantificações, num intervalo de tempo de aproximadamente 5 anos e o doente Y apresenta 7 quantificações, num período de aproximadamente 3 anos. Os doentes são representados por letras e alguns doentes foram excluídos desta análise, devida a inexistência de dados suficientes no caso de alguns doentes.

Uma vez que os doentes do grupo de estudo apresentam um perfil terapêutico muito variável e de forma a indicar os momentos em que os doentes efetivamente se encontravam submetidos a agentes biológicos, elaborou-se uma tabela que resume esses dados. A abordagem terapêutica dos doentes do grupo de estudo é apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Abordagem terapêutica dos doentes do grupo de estudo, com fármacos biológicos.

Tempo	Doente	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		ADA	Não	ETA	Não	ADA	Não	ADA	ADA	ETA
2		ADA	Não	ETA	Não	ADA	ETA	ADA	ADA	ETA
3		ADA	Não	ETA	Não	ADA	ETA	ADA	ADA	ETA
4		ADA	Não	ETA	Não	ADA	ETA	RTX	ADA	RTX
5		ADA	Não	ETA	Não	ADA	ETA	RTX	ADA	RTX
6		ADA	Não	ETA	RTX	ADA	ETA	RTX	ADA	RTX
7		TCZ	GOL	ETA	RTX	ETA	ETA	RTX	ADA	RTX
8		TCZ	GOL	ETA		ETA	ETA	RTX	ADA	Não
9		TCZ						Não	ADA	Não
10		TCZ						RTX	Não	RTX
Período de acompanhamento		3 anos e 2 meses	2 anos e 7 meses	2 anos e 4 meses	2 anos e 5 meses	2 anos e 10 meses	2 anos e 3 meses	3 anos e 5 meses	3 anos e 8 meses	3 anos e 8 meses

ADA - adalimumab; TCZ - tocilizumab; GOL - golimumab; ETA - etanercept; RTX - rituximab.

4.1 Perfil de evolução da atividade da doença

O perfil de evolução do DAS28 ao longo do tempo para o grupo de controlo e para o grupo de estudo é apresentado nos gráficos 3 e 4, respetivamente.

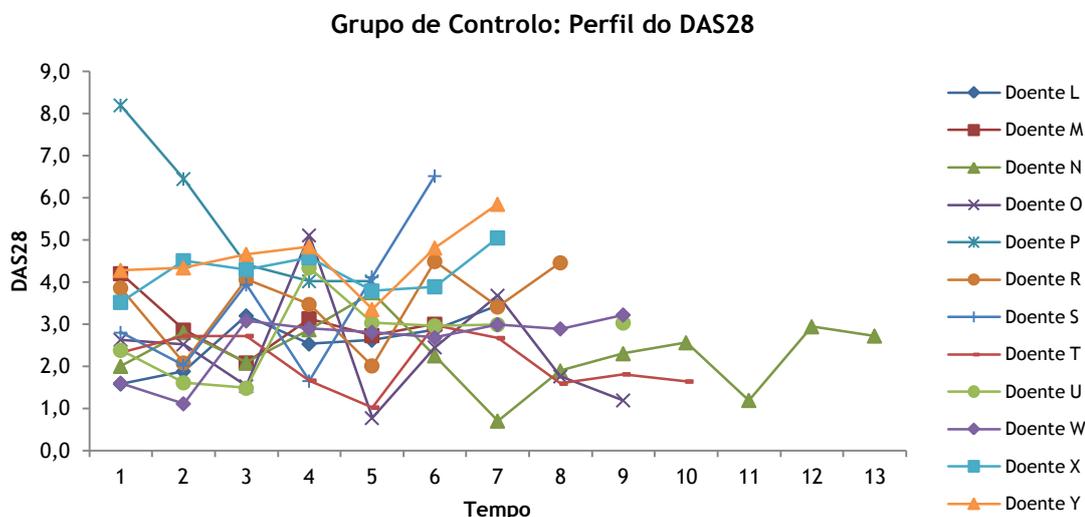


Gráfico 3. Perfil de evolução do DAS28 ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.

Pela análise do gráfico 3 podemos observar que a generalidade dos pontos relativos à medição do DAS28 se localiza num intervalo de valores inferiores a 3,2, sugerindo a existência de um padrão. No entanto, é importante salientar que a evolução do DAS28 para cada doente apresenta uma grande variabilidade ao longo do tempo, isto é, é muitas vezes marcada por progressões rápidas da evolução da doença ou por remissões parciais da sua atividade. O gráfico apresentado é representativo da variabilidade interindividual em resposta a uma abordagem terapêutica semelhante.

Os doentes L, M, N, T, U e W apresentam, na generalidade dos momentos de medição, valores de DAS28 inferiores a 3,2, que correspondem a uma baixa atividade da doença, apesar destes momentos ser interrompidos por ligeiros aumentos da atividade da patologia. Estes dados mostram e sugerem a imprevisibilidade de evolução da AR.

Como se pode observar no gráfico 3, os doentes que se encontram fora do padrão, anteriormente descrito, são os doentes O, P, X e Y.

O doente O, no momento 4, passou de um valor de DAS28 que corresponde à remissão da doença (1,5) para um valor que corresponde a elevada atividade da doença (5,1), sem que tenha ocorrido um agravamento físico e sintomatológico da doença, o que levou a que o médico responsável questionasse deste valor.

O doente P apresenta valores de DAS28 superiores a 3,2 durante todo o período de acompanhamento, que correspondem a uma atividade moderada e elevada da patologia. Este doente sofre de uma grave depressão e apresenta por isso uma sensibilidade à dor muito

elevada, o que torna a avaliação das articulações afetadas e sensíveis pouco fidedigna. Além disso, este doente é diabético, pelo que também os valores da VS tentem a ser elevados, mesmo que não diretamente relacionados com a AR, o que por sua vez leva a um aumento do *score* de atividade da doença.

O doente X apresenta valores de DAS28 superiores a 3,2 durante todo o período de acompanhamento, que correspondem a uma atividade elevada da patologia. Este doente tem também osteoporose, queratoses actínicas e problemas cardiovasculares e é um doente muito sintomatológico no que diz respeito à AR. Está a ser avaliado para iniciar terapêutica biológica.

O doente Y, para além de AR, apresenta insuficiência renal crónica. Este doente apresenta valores de DAS28 elevados, que correspondem a uma atividade moderada e elevada da doença. No entanto, do ponto de vista físico este doente não apresenta grandes limitações. A persistência de valores de DAS28 muito elevado por ser um resultado de valores de VS elevados, em resposta à insuficiência renal crónica.

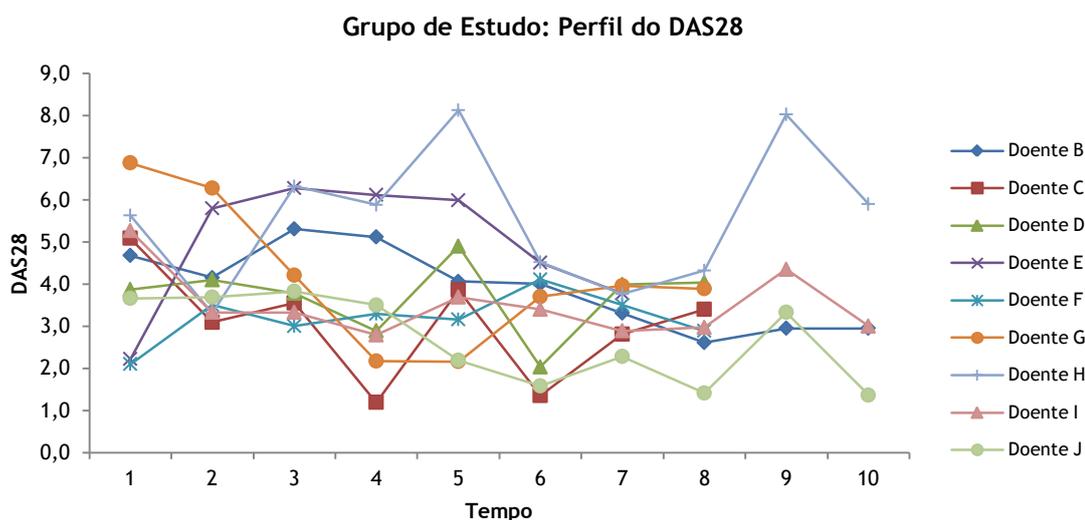


Gráfico 4. Perfil de evolução do DAS28 ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

Pela análise do gráfico 4 podemos observar que, ao contrário do gráfico anterior, a generalidade dos pontos relativos à medição do DAS28 se localiza num intervalo de valores superiores a 3,2 e em contrapartida, à semelhança do gráfico anterior, a evolução do DAS28 para cada doente apresenta uma grande variabilidade ao longo do tempo.

Na análise deste grupo de estudo, uma vez que este é muito heterogéneo em termos dos fármacos biológicos prescritos, elaboraram-se os gráficos com os perfis individuais, gráficos de 5 a 13, de forma a facilitar a análise dos mesmos. Nos gráficos seguintes encontram-se marcados os momentos em que os doentes se encontravam a realizar tratamento com agentes biológicos, o agente usado e os momentos em que houve alteração do mesmo. A análise mais detalhada dos perfis destes doentes foi realizada em paralelo com a tabela 12.

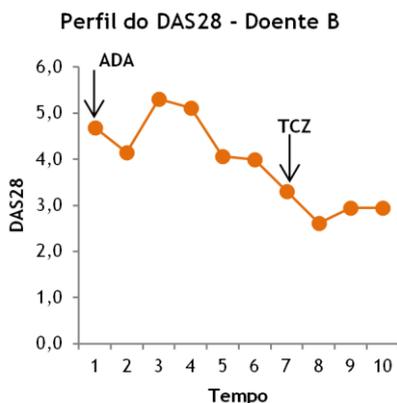


Gráfico 5. Perfil de evolução do DAS28 do doente B ao longo do tempo.

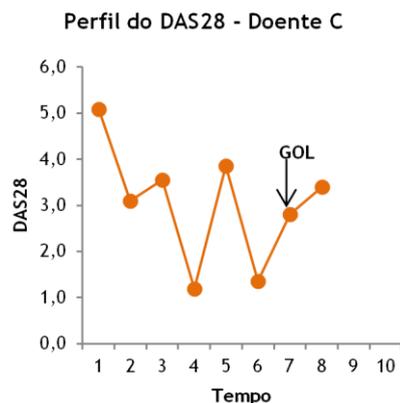


Gráfico 6. Perfil de evolução do DAS28 do doente C ao longo do tempo.

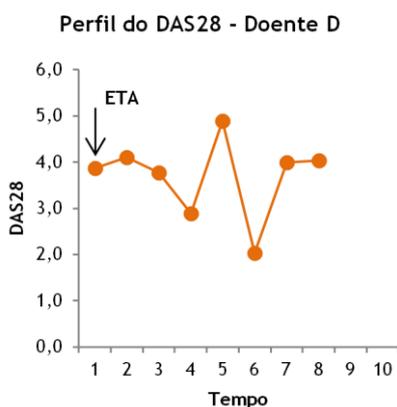


Gráfico 7. Perfil de evolução do DAS28 do doente D ao longo do tempo.

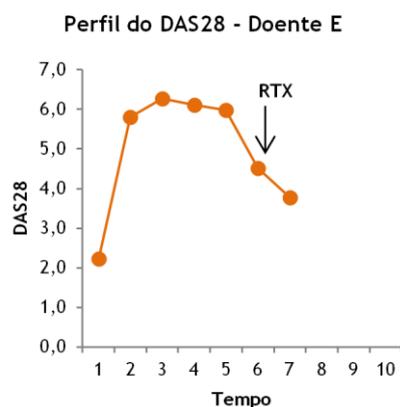


Gráfico 8. Perfil de evolução do DAS28 do doente E ao longo do tempo.

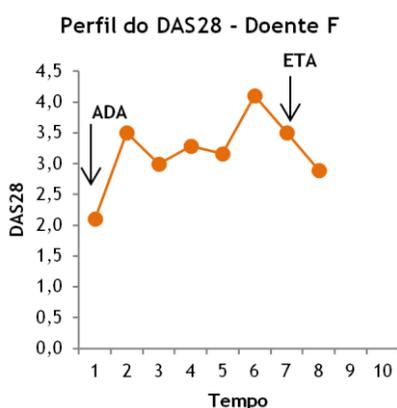


Gráfico 9. Perfil de evolução do DAS28 do doente F ao longo do tempo.

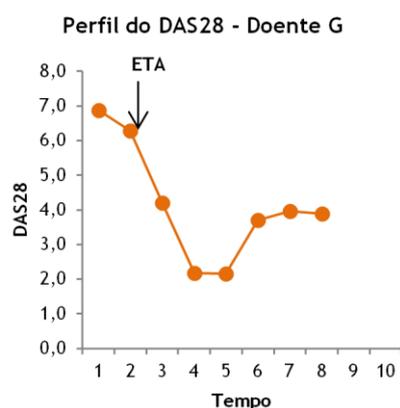


Gráfico 10. Perfil de evolução do DAS28 do doente G ao longo do tempo.

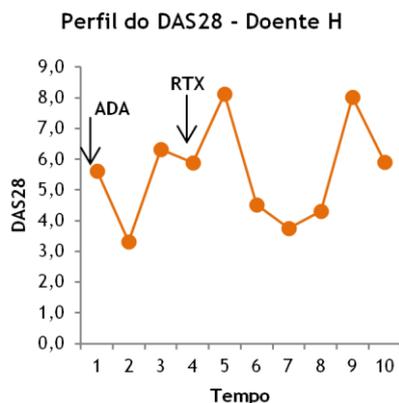


Gráfico 11. Perfil de evolução do DAS28 do doente H ao longo do tempo.

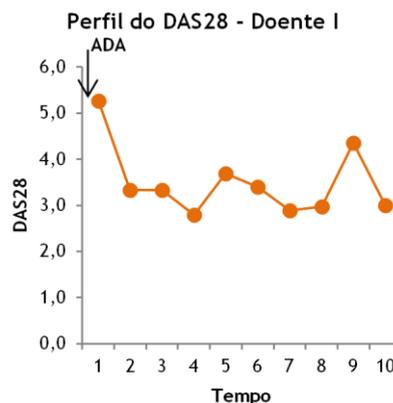


Gráfico 12. Perfil de evolução do DAS28 do doente I ao longo do tempo.

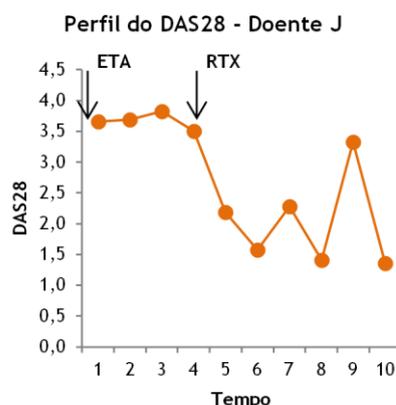


Gráfico 13. Perfil de evolução do DAS28 do doente J ao longo do tempo.

Todos os doentes, à exceção do doente E, efetuaram terapêutica com antagonistas do TNF- α em determinados momentos do seu tratamento. Apesar da variedade de fármacos prescritos, ADA, GOL e ETA, todos eles têm o mesmo alvo molecular, o TNF- α . Como se pode observar nos gráficos 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 e 14, os perfis individuais mostram uma evolução bastante diferente. O doente I efetuou tratamento com ADA e isto levou a uma diminuição dos valores de DAS28, enquanto que o doente D, que fez tratamento com ETA, mostra um perfil de evolução da doença muito inconstante, sendo este interrompido por remissões parciais e progressões rápidas da doença.

Ambos os doentes D e G efetuaram tratamento com o ETA. No entanto, o perfil destes dois doentes é completamente distinto, sendo que, aparentemente, no caso do doente G o fármaco prescrito parece ter controlado a atividade da doença, ao contrário do doente D. Este último é um doente com patologias concomitantes, entre elas, psoríase.

Os doentes B, F e I efetuaram tratamento com o ADA. No caso do doente I, o tratamento conduziu ao controlo da atividade da doença. No caso dos doentes B e F, o perfil é marcado

por progressões e diminuições ligeiras da atividade da doença. Os doentes B e I têm osteoporose, que pode interferir com o processo inflamatório.

Os doentes J e H efetuaram terapêutica com o RTX, que tem como alvo molecular o antigénio CD20 dos linfócitos B. Também neste caso a diferença nos perfis é notória, sendo que no caso do doente J, a introdução deste fármaco levou a uma diminuição do DAS28, ao contrário do que aconteceu com o doente H. no entanto, ambos os perfis são marcados por progressões e remissões parciais da atividade da doença.

Relativamente ao doente E, não se podem retirar grandes conclusões, uma vez que o perfil do DAS28 a partir do momento em que o doente iniciou o fármaco biológico, o RTX, é muito curto.

4.2 Perfil de evolução da velocidade de sedimentação

O perfil de evolução da VS ao longo do tempo para o grupo de controlo e para o grupo de estudo é apresentado nos gráficos 14 e 15, respetivamente.

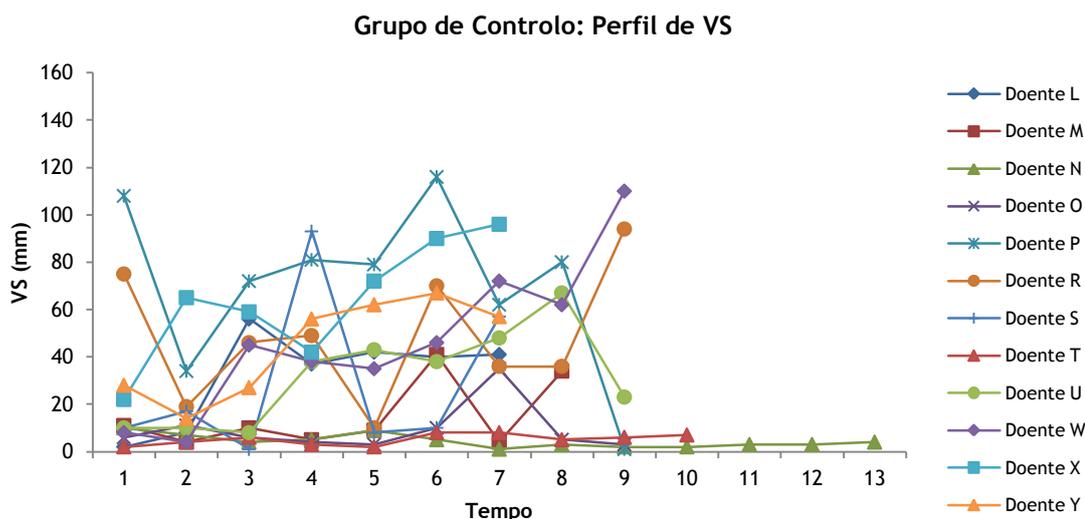


Gráfico 14. Perfil de evolução da VS ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.

Pela análise do gráfico 14 podemos observar que a generalidade dos pontos relativos à quantificação da VS se localiza num intervalo de valores inferiores a 20 mm, sugerindo a existência de um padrão. Neste padrão encaixam-se os doentes M, N, O e T. Nos restantes casos analisados, a evolução da VS não é linear, sendo que os doentes apresentam valores acima do intervalo de referência para este parâmetro.

O doente L teve um aumento brusco da VS no momento 3, que se manteve ao longo do tempo. Este doente apresenta baixa atividade da AR e apresenta sintomatologia física estável. No processo clínico não constava qualquer informação que ajude a justificar o aumento persistente da VS.

O doente P, como já foi referido na análise do gráfico 3, é diabético, pelo que a perfil de evolução da VS, marcado por valores persistentemente elevados é explicado por este quadro clínico, uma vez que a diabetes apresenta, à semelhança da AR, um historial inflamatório bem marcado.

O doente R também apresenta valores de VS persistentemente elevados. Este doente apresenta uma sintomatologia física bastante marcada, com lesões compatíveis com a AR, que levam à elevação da VS. Além disso, do ponto de vista do DAS28, este doente apresenta atividade moderada a elevada da doença, razão pela qual está sinalizado para iniciar terapêutica biológica.

O doente X, como já foi referido, é um doente que apresenta uma forte sintomatologia da AR, pelo que os valores elevados da VS estão diretamente relacionados com a patologia. Está a ser avaliado para iniciar terapêutica biológica.

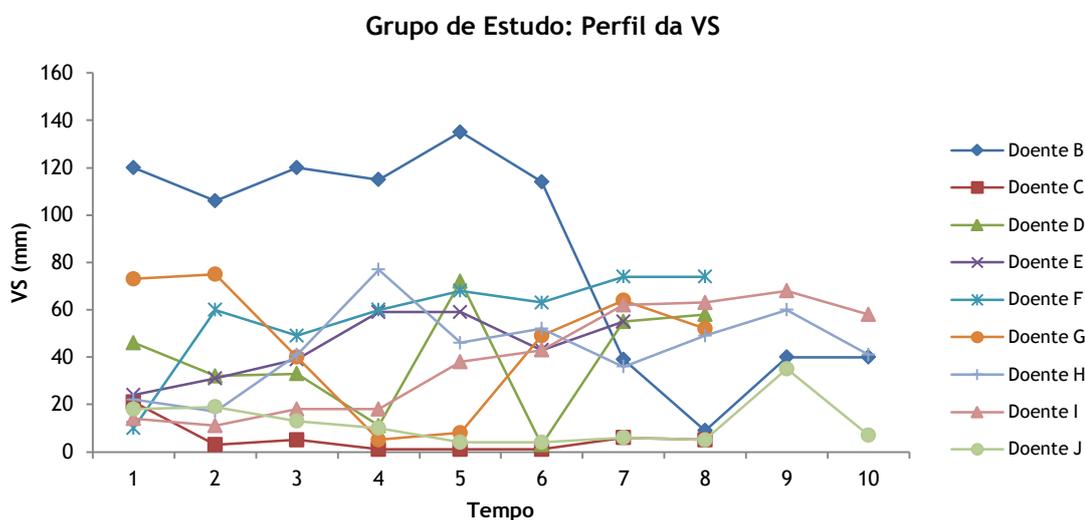


Gráfico 15. Perfil de evolução da VS ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

Pela análise do gráfico 15, relativa à evolução da VS no grupo de estudo, observa-se que, ao contrário do perfil do grupo de controlo, a generalidade dos pontos relativos à quantificação da VS se localiza num intervalo de valores superiores a 40 mm. Em contrapartida, à semelhança do gráfico anterior, a evolução do VS para cada doente não é linear.

O doente J apresenta a maioria dos valores da VS dentro dos valores de referência, sendo que no momento 9, onde houve um aumento significativo da VS, correspondeu à suspensão do tratamento com o RTX. O doente C apresenta também valores de VS controlados, dentro dos valores de referência. Avaliando estes dois doentes através do DAS28, regista-se que apresentam atividades da doença baixas a moderadas, embora este seja bastante instável no caso do doente C.

O doente B mantinha até ao momento 6, valores de VS persistentemente elevados, ocasião na qual efetuava tratamento com o ADA. Após introdução de um fármaco biológico distinto, o

TCZ, os valores de VS baixaram significativamente. Além disso, esta alteração de terapêutica conduziu também a uma estabilização da atividade da doença.

O doente F, apesar de apresentar valores de VS elevados durante o tratamento com o ADA, após a substituição deste fármaco pelo ETA, os valores de VS aumentaram ainda mais. O motivo que esteve na origem desta substituição foi o facto do segundo agente ser menos imunogénico.

O doente D efetuou tratamento com o ETA e durante todo este período manteve valores de VS elevados. Além disso, o perfil do DAS28 revela que a atividade da doença não está controlada. Como já foi referido, este doente tem também psoríase, que afeta também a VS, devido ao processo inflamatório observado.

O doente E apresenta valores de VS persistentemente elevados. No entanto, não se podem retirar grandes conclusões no que diz respeito ao impacto do agente biológico RTX nos valores de VS, uma vez que o perfil a partir do momento em que o doente iniciou esse fármaco é muito curto.

No caso do doente G, a introdução do agente biológico ETA não parece ter tido um impacto benéfico nos valores de VS. No entanto, estes valores persistentemente elevados podem ser devidos ao facto deste doente ter várias patologias concomitantes, como osteoporose e insuficiência renal crónica. Aliás, do ponto de vista do DAS28, este doente apresenta um perfil de atividade da AR controlado.

Relativamente ao doente H, este efetuava tratamento com o agente biológico ADA e a partir do momento 4, este fármaco foi substituído pelo RTX. No que diz respeito à VS, observa-se que, após esta alteração, o perfil de valores da VS aumentou. Observa-se também que relativamente ao DAS28, a introdução do RTX não levou a um controlo da atividade da doença, sendo que este doente mantém valores de DAS28 bastante elevados.

4.3 Perfil leucocitário

O perfil de evolução do número de leucócitos ao longo do tempo para o grupo de controlo e para o grupo de estudo é apresentado nos gráficos 16 e 17, respetivamente.

No que diz respeito aos leucócitos, sabe-se que a sua contagem é muito variável na população e num mesmo indivíduo, sendo que o intervalo de valores de referência é entre $3,04$ e $8,54 \times 10^3/\mu\text{L}$. Oscilações no seu valor dentro do intervalo de referência refletem o normal funcionamento do sistema imunitário.

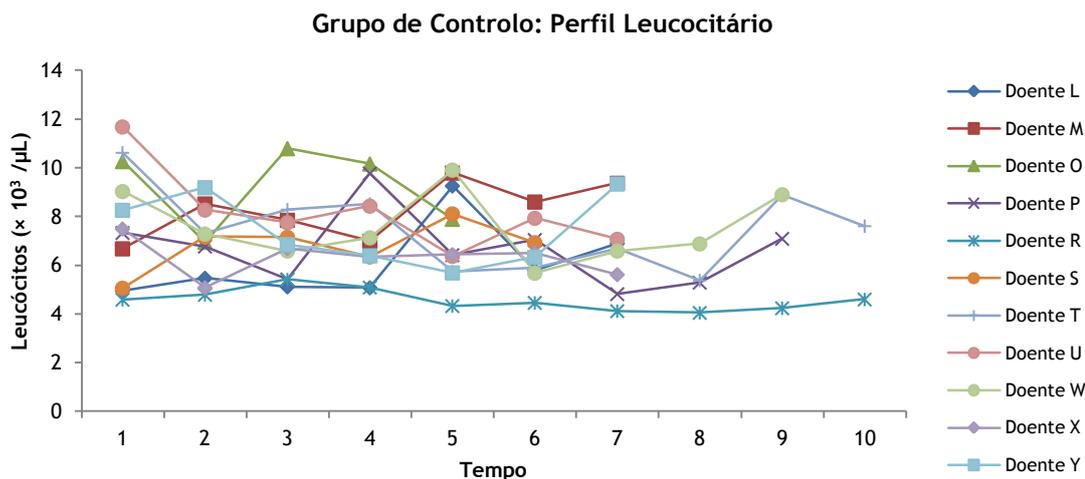


Gráfico 16. Perfil de evolução do número de leucócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.

Como se pode observar no gráfico 16, a generalidade dos doentes apresenta um perfil do número de leucócitos dentro dos valores normais. No entanto, os doentes M, O e W apresentam valores significativamente elevados, o que é compatível com as características clínicas da AR. O doente W tem osteoporose e à data do aumento do número de leucócitos sofreu uma fratura óssea, o que explica a leucocitose. O doente O apresenta no seu historial clínico vários episódios de vômitos, causados pela medicação prescrita, o que pode ser a causa da leucocitose. Relativamente ao doente M, não existe nenhuma referência no processo clínico que ajude a explicar a leucocitose observada.

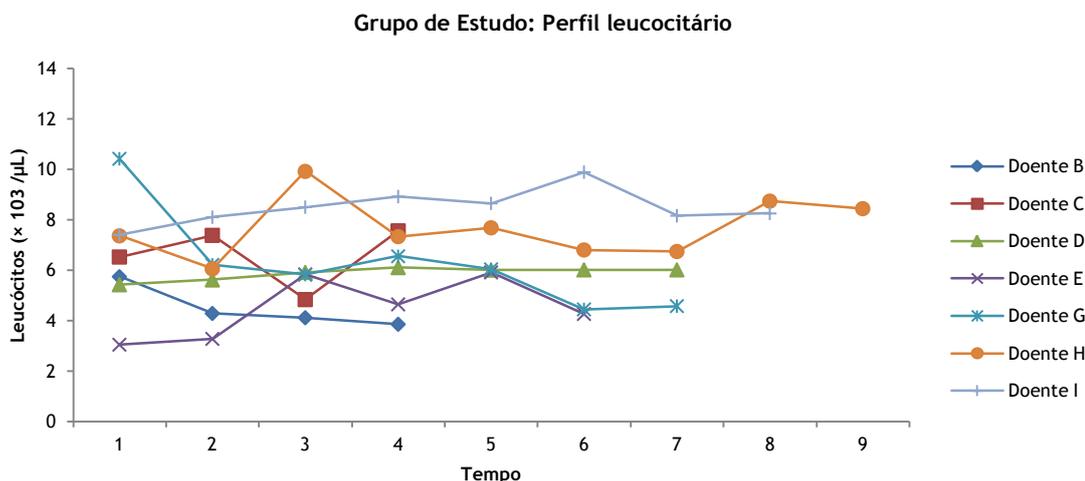


Gráfico 17. Perfil de evolução do número de leucócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

Relativamente ao grupo de estudo, pela análise do gráfico 17, observa-se que a generalidade dos doentes apresenta um perfil do número de leucócitos dentro dos valores normais. Os doentes H e I apresentam valores de leucócitos acima dos valores de referência. No caso do doente I, os momentos em que se observou leucocitose, coincidiram com uma cirurgia

operada e padrão inflamatório articular. Os momentos de leucocitose observados no doente H podem ser explicados pela ausência de controlo da atividade da doença e pela existência de lesões articulares.

4.4 Perfil eritrocitário

O perfil de evolução do número de eritrócitos ao longo do tempo para o grupo de controlo e para o grupo de estudo é apresentado nos gráficos 18 e 19, respetivamente.

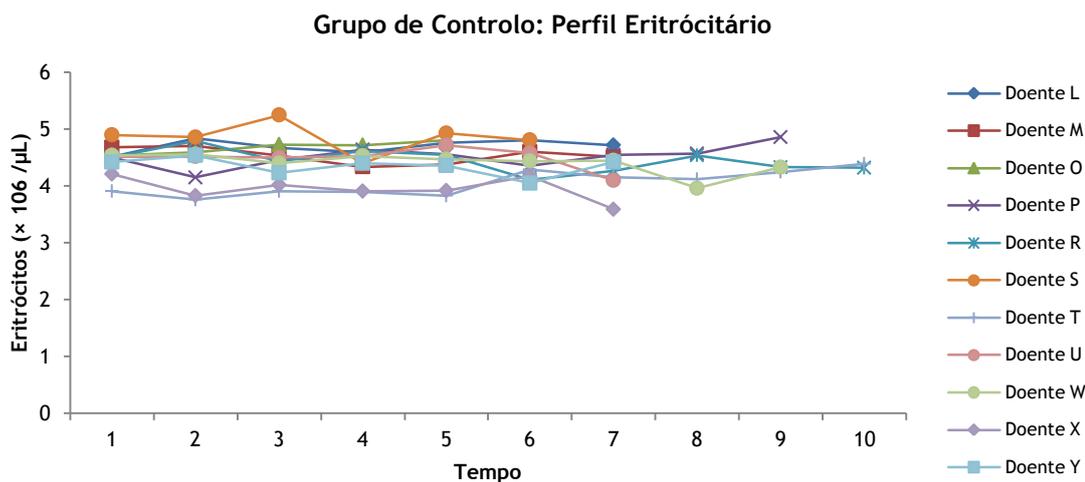


Gráfico 18. Perfil de evolução do número de eritrócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de controlo.

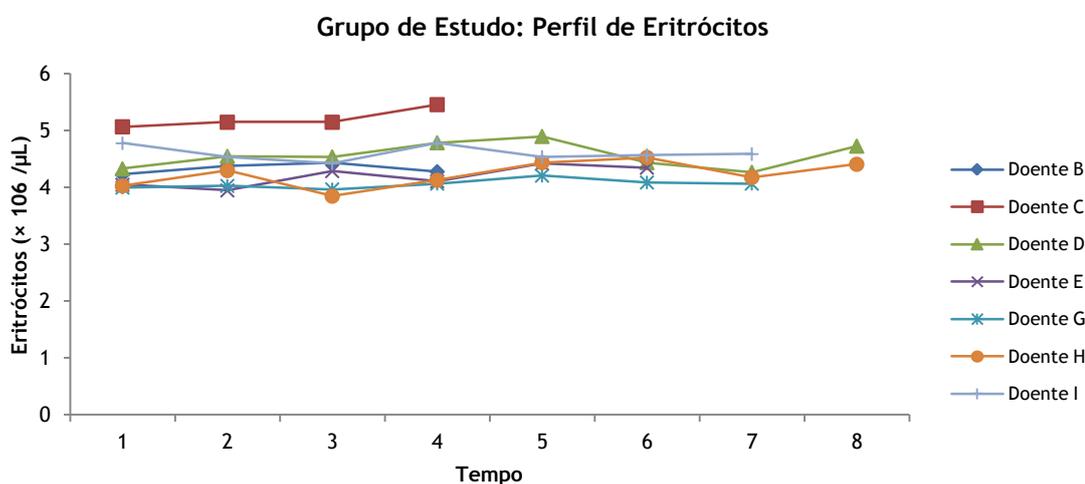


Gráfico 19. Perfil de evolução do número de eritrócitos ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

Uma das consequências mais severas da AR é a anemia frequentemente observada nos doentes. No que diz respeito ao número de eritrócitos, como se pode observar nos gráficos 18 e 19, os valores oscilam sempre dentro do intervalo de referência definido, $3,78-4,99 \times 10^6/\mu\text{L}$ eritrócitos.

Pela análise dos valores de hemoglobina ao longo do tempo para cada doente de ambos os grupos, registou-se que grande maioria mantém valores dentro dos intervalos de referência, o que traduz, em certa forma, a eficácia do tratamento efetuado. Apenas o doente D do grupo de estudo revelou valores de hemoglobina abaixo dos valores de referência. De salientar que este doente tem uma alimentação deficiente, o que aliado à AR explica os resultados registados relativamente à quantidade de hemoglobina.

4.5 Perfil plaquetário

O perfil de evolução do número de plaquetas ao longo do tempo para o grupo de controlo e para o grupo de estudo é apresentado nos gráficos 20 e 21, respetivamente.

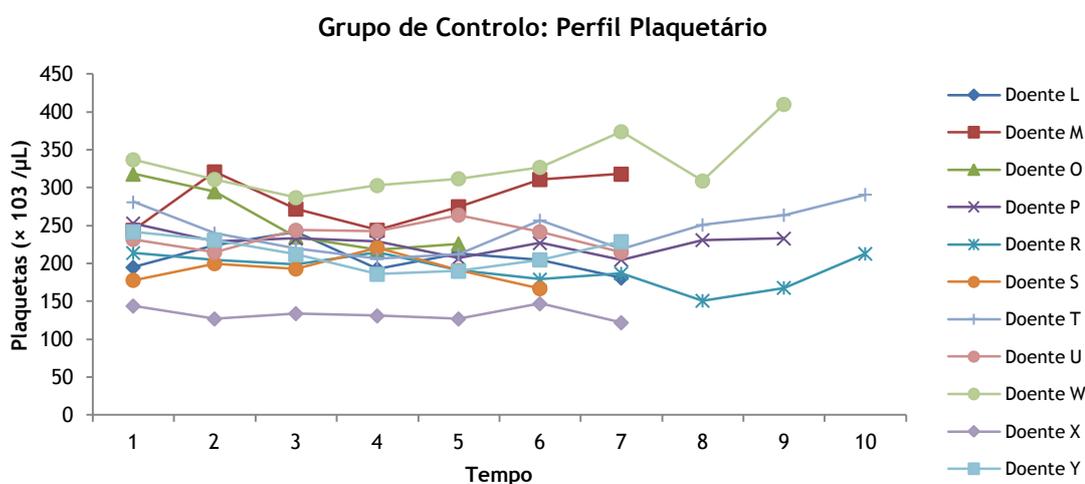


Gráfico 20. Perfil de evolução do número de plaquetas ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

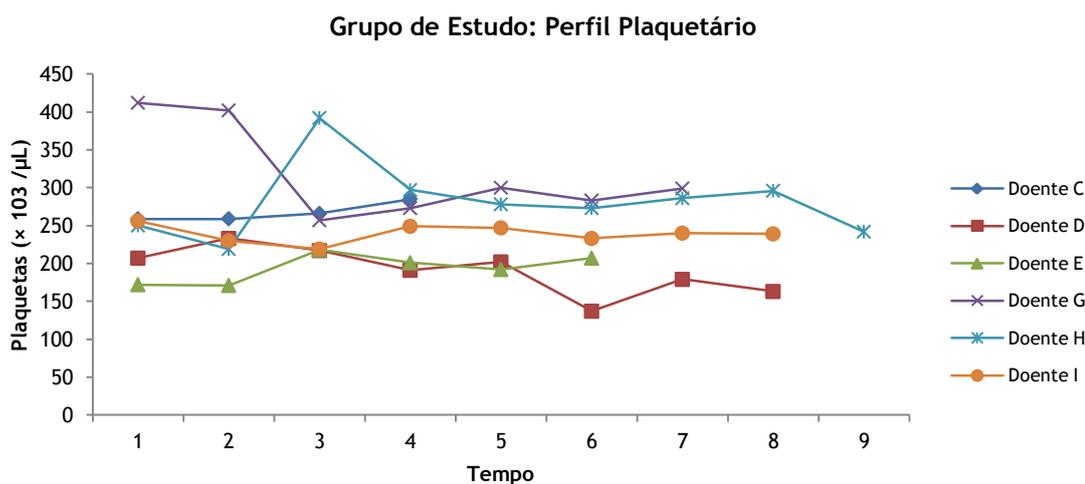


Gráfico 21. Perfil de evolução do número de plaquetas ao longo do tempo nos doentes do grupo de estudo.

Relativamente às plaquetas, o intervalo de referência está definido ente 150 e $361 \times 10^3/\mu\text{L}$. A contagem de plaquetas apresenta uma particularidade interindividual que é o facto de cada pessoa manter um valor relativamente constante de plaquetas, com pequenas oscilações. Os gráficos 20 e 21 são representativos deste facto.

A generalidade dos doentes de ambos os grupos apresenta valores dentro do intervalo de referência para a contagem de plaquetas. No entanto, o doente W do grupo de controlo e o doente G do grupo de estudo apresentam determinações acima dos valores de referência. A trombocitose observada no perfil do doente G corresponde ao agravamento clínico da doença. O doente W apresenta um historial de trombooses.

5. Análise de correlações entre parâmetros

Partindo dos resultados analíticos disponíveis e das determinações de DAS28 registadas nos processos clínicos, testou-se a correlação alguns dos parâmetros serológicos com este *score*.

Nesta análise, o número de determinações disponíveis da quantificação de cada parâmetro (n) varia entre os grupos definidos.

5.1 Parâmetros hematológicos

Dentro do grupo de parâmetros hematológicos tipicamente propostos para a monitorização dos doentes com AR, destaca-se a importância da VS para avaliar o nível de inflamação e monitorizar a progressão da doença.

Neste estudo, analisou-se a correlação entre a VS e o DAS28. Estes resultados são apresentados nos gráficos 22 e 23, para o grupo de controlo e para o grupo de estudo respetivamente.

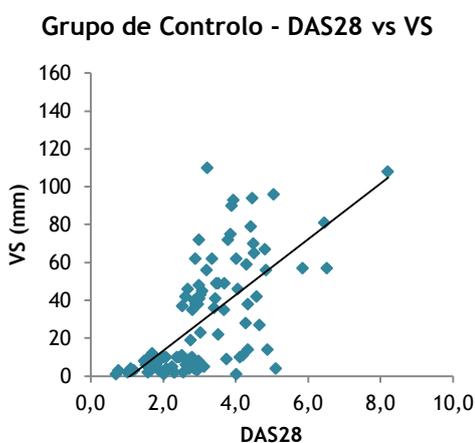


Gráfico 22. Correlação entre o DAS28 e VS no grupo de controlo.

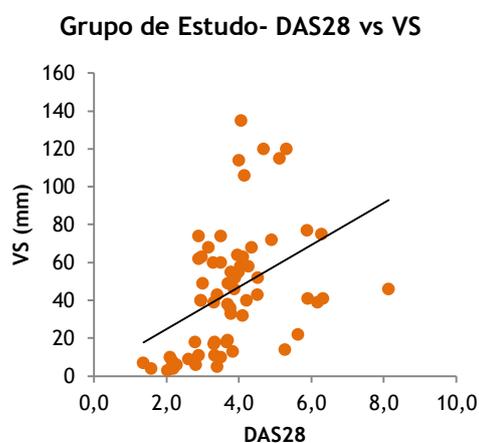


Gráfico 23. Correlação entre o DAS28 e VS no grupo de estudo.

Como se pode observar pelos gráficos acima apresentados, existe uma correlação positiva entre o DAS28 e a VS, isto é, estes parâmetros são diretamente proporcionais e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram 0,44 e 0,18 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente.

Nesta análise, devido à existência de um número de determinações analíticas da VS e respetivos DAS28 razoáveis, definiram-se grupos, de acordo com os critérios de atividade da AR definidos. Assim, foram definidos quatro grupos, com base nos intervalos de DAS28: DAS28 < 2,6; 2,7 < DAS28 < 3,2; 3,3 < DAS28 < 5,1; DAS28 > 5,2. Como esta abordagem, pretendeu-se averiguar se existem diferenças estatisticamente significativas em termos da VS entre cada um destes grupos, para o grupo de controlo e para o grupo de estudo.

Para efetuar a análise comparativa entre estes quatro grupos definidos, recorreu-se ao teste One-Way-Anova. Para averiguar em que grupos os valores de VS eram estatisticamente diferentes, recorreu-se a testes de comparações múltiplas, teste Turkey HSD, Scheffe, LSD e Bonferroni. O resultado desta análise é apresentado na tabela 12.

Tabela 12. Valores médios de VS e respetivos desvios padrão em cada intervalo de valores do DAS28 para o grupo de controlo e o grupo de estudo.

Intervalos de DAS28	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo	
	VS (mm)			
	n	Média ± SD	n	Média ± SD
DAS28 < 2,6	36	6,66±6,20	8	6,38±2,56
2,7 < DAS28 < 3,2	27	29,22±26,52	10	43,10±24,54
3,3 < DAS28 < 5,1	33	47,42±27,94	36	52,53±32,68
DAS28 > 5,2	4	75,75±24,30	9	52,78±32,72

No grupo de controlo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de 5%, dos valores de VS entre todos grupos de intervalos DAS28, exceto entre os intervalos 3,3 < DAS28 < 5,1 e DAS28 > 5,2.

No grupo de estudo, observou-se que no intervalo 2,7 < DAS28 < 3,2 não existem diferenças estatisticamente significativas dos valores de VS com os restantes intervalos de valores de DAS28. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas, ao nível de 5%, entre o grupo DAS28 < 2,6 e os grupos 3,3 < DAS28 < 5,1 e DAS28 > 5,2.

Entre o grupo de controlo e o grupo de estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores de VS em cada um dos intervalos definidos pelos valores de DAS28. Os resultados desta análise são apresentados no gráfico 24.

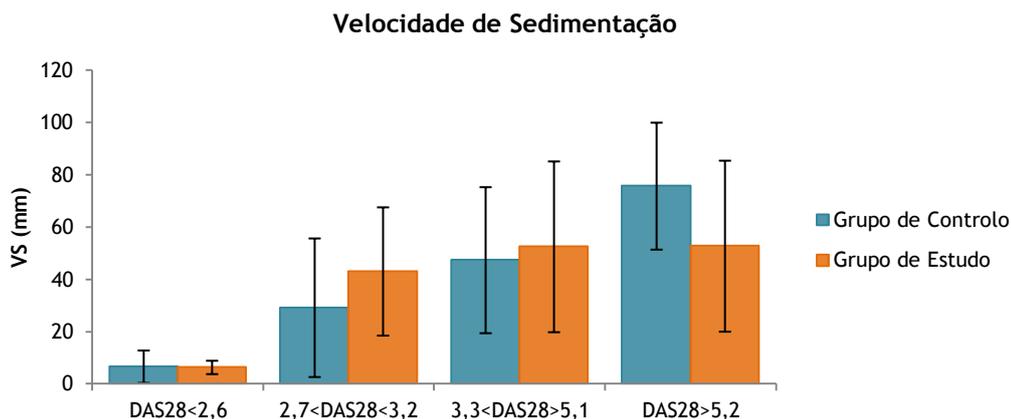


Gráfico 24. Comparação dos valores médios de VS e respetivos desvios padrão para cada grupo definido pelos valores de DAS28 no grupo de controlo e no grupo de estudo.

No contexto desta análise, procedeu-se a uma pesquisa semelhante à efetuada para a VS para os valores de hemoglobina no grupo de controlo e no grupo de estudo. O resultado desta análise é apresentado nos gráficos 25 e 26.

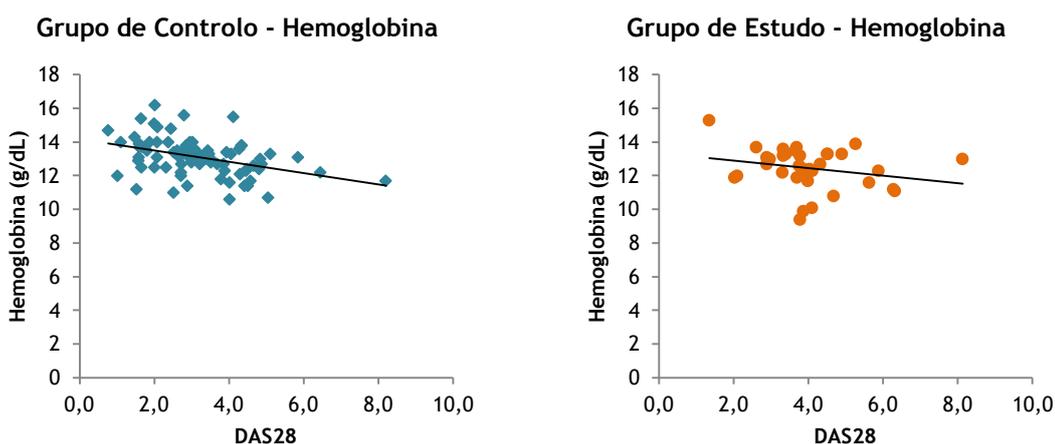


Gráfico 25. Correlação entre o DAS28 e a hemoglobina no grupo de controlo.

Gráfico 26. Correlação entre o DAS28 e a hemoglobina no grupo de estudo.

Como se pode observar pelos gráficos acima apresentados, existe uma correlação negativa entre o DAS28 e a hemoglobina, isto é, estes parâmetros são inversamente proporcionais e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram 0,16 e 0,06 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente.

Na análise deste parâmetro, à semelhança do anterior, definiram-se grupos de acordo com os critérios de atividade da AR definidos. Assim, foram definidos quatro grupos, com base nos intervalos de DAS28: $DAS28 < 2,6$; $2,7 < DAS28 < 3,2$; $3,3 < DAS28 < 5,1$; $DAS28 > 5,2$. Como esta nova abordagem, pretendeu-se averiguar se existem diferenças estatisticamente significativas em termos da quantidade de hemoglobina entre cada um destes grupos, dentro dos grupos de controlo e de estudo.

Para efetuar a análise comparativa entre estes quatro grupos definidos, recorreu-se ao teste One-Way-Anova. Para averiguar em que grupos os valores de hemoglobina eram estatisticamente diferentes, recorreu-se a testes de comparações múltiplas, teste Turkey HSD, Scheffe, LSD e Bonferroni. O resultado desta análise é apresentado na tabela 13.

Tabela 13. Valores médios de hemoglobina e respetivos desvios padrão em cada intervalo de valores do DAS28 para os grupos de controlo e de estudo.

Intervalos de DAS28	Grupo de Controlo		Grupo de Estudo	
	Hemoglobina (g/dL)			
	n	Média ± SD	n	Média ± SD
DAS28 < 2,6	27	13,6±1,2	4	13,2±1,6
2,7 < DAS28 <3,2	21	13,2±0,9	3	12,9±0,2
3,3 < DAS28 < 5,1	30	12,7±1,0	22	12,3±1,2
DAS28 > 5,2	3	12,3±0,7	6	12,2±1,1

No grupo de controlo, existem diferenças estatisticamente significativas dos valores de hemoglobina entre os grupos de DAS28 < 2,6 e 3,3 < DAS28 < 5,1.

No grupo de estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Entre o grupo de controlo e o grupo de estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores de hemoglobina em cada um dos intervalos definidos pelos valores de DAS28. Os resultados desta análise são apresentados no gráfico 27.

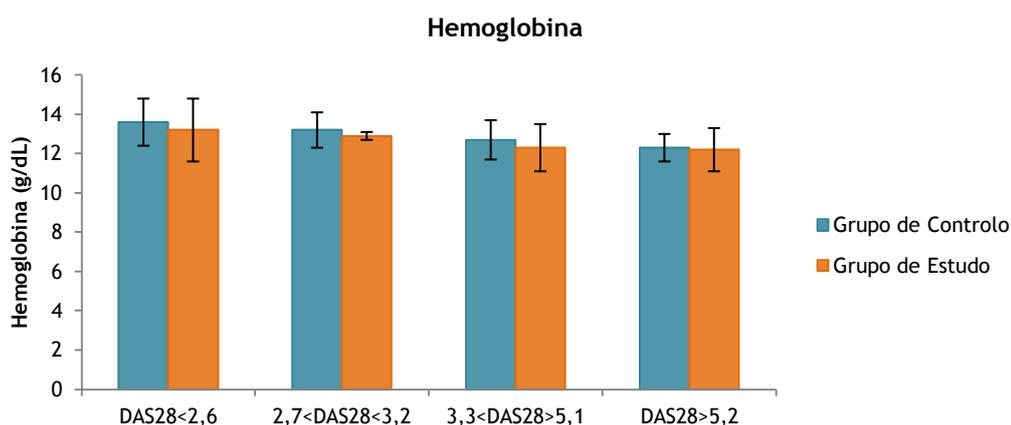


Gráfico 27. Comparação dos valores médios de hemoglobina e respetivos desvios padrão para cada grupo definido pelos valores de DAS28 no grupo de controlo e no grupo de estudo.

5.2 Parâmetros imunológicos

No grupo de parâmetros imunológicos analisou-se a correlação entre os anticorpos anti-CCP, anti-MCV e FR IgA com o DAS28. Uma vez que a disparidade entre os valores máximos e mínimos nestes parâmetros é grande, optou-se por converter a escala de valores dos anticorpos em escala logarítmica.

Os gráficos 28 e 29 apresentam a correlação do logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP em função do DAS28 para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, respetivamente.

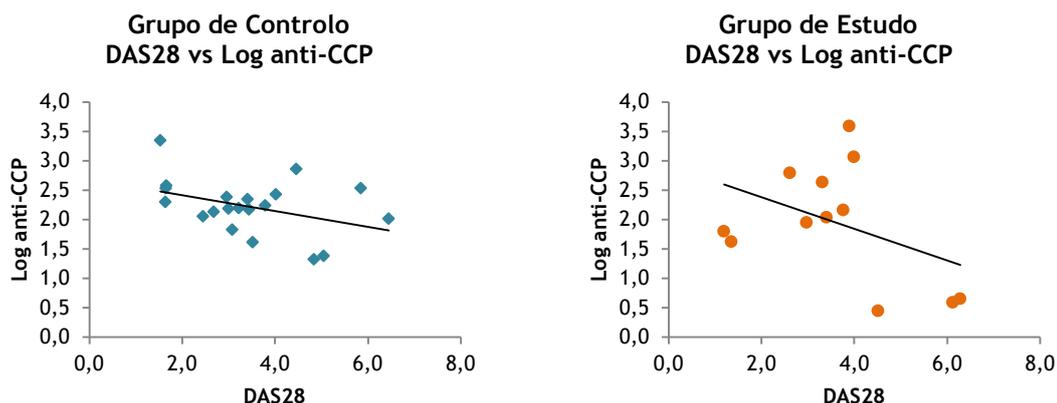


Gráfico 28. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP no grupo de controlo.

Gráfico 29. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP no grupo de estudo.

Como se pode observar pelos gráficos acima apresentados e pelos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, 0,16 e 0,18 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente, a correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-CCP é fraca.

Os gráficos 30 e 31 apresentam a correlação do logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV em função do DAS28 para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, respetivamente.

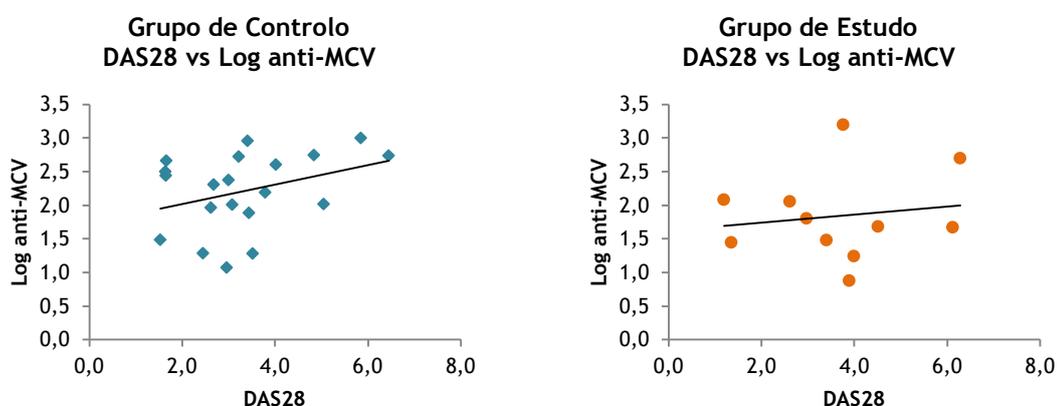


Gráfico 30. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV no grupo de controlo.

Gráfico 31. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV no grupo de estudo.

Como se pode observar pelos gráficos acima apresentados e pelos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, 0,12 e 0,02 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente, a correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de anticorpos anti-MCV não é clara.

Os gráficos 32 e 33 apresentam a correlação do logaritmo dos valores de FR IgA em função do DAS28 para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, respetivamente.

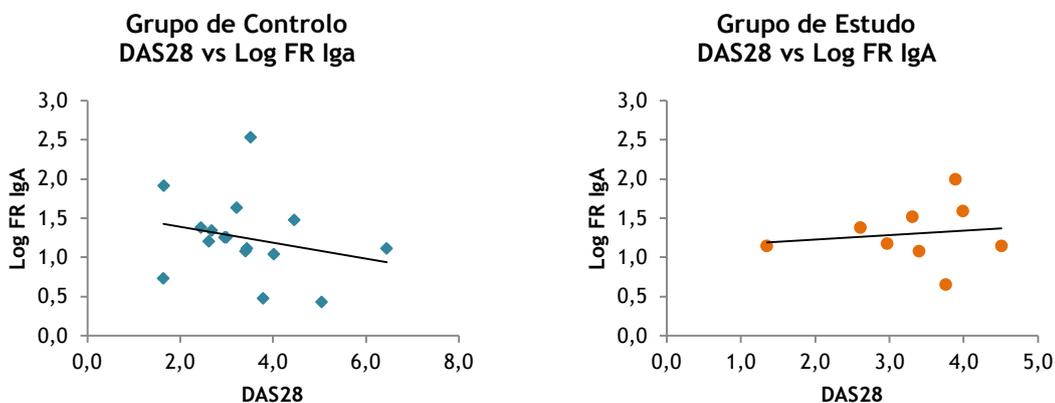


Gráfico 32. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de FR IgA no grupo de controlo.

Gráfico 33. Correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de FR IgA no grupo de estudo.

Como se pode observar pelos gráficos acima apresentados e pelos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, 0,06 e 0,02 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente, a correlação entre o DAS28 e o logaritmo dos valores de FR IgA não é clara.

Devido às fracas correlações obtidas na análise efetuada com os parâmetros imunológicos, como o objetivo de pesquisar uma relação de prognóstico entre estes parâmetros e o índice de atividade da doença, DAS28, recorreu-se ao cálculo de índices a partir das determinações analíticas.

O cálculo dos índices foi realizado partindo das relações observadas entre os anticorpos, descritas na literatura. Os anticorpos anti-CCP têm sido associados à progressão erosiva da doença e às manifestações extra-articulares, os anticorpos anti-MCV estão associadas à progressão erosiva da doença e o FR IgA às manifestações extra-articulares da AR⁷⁴.

Assim, calcularam-se as razões entre anticorpos anti-MCV/ anticorpos anti-CCP e FR IgA/ anticorpos anti-CCP.

Os gráficos 34 e 35 mostram a correlação entre o DAS28 e as razões entre anticorpos anti-MCV/ anticorpos anti-CCP e FR IgA/ anticorpos anti-CCP, para o grupo de controlo e para o grupo de estudo, respetivamente.

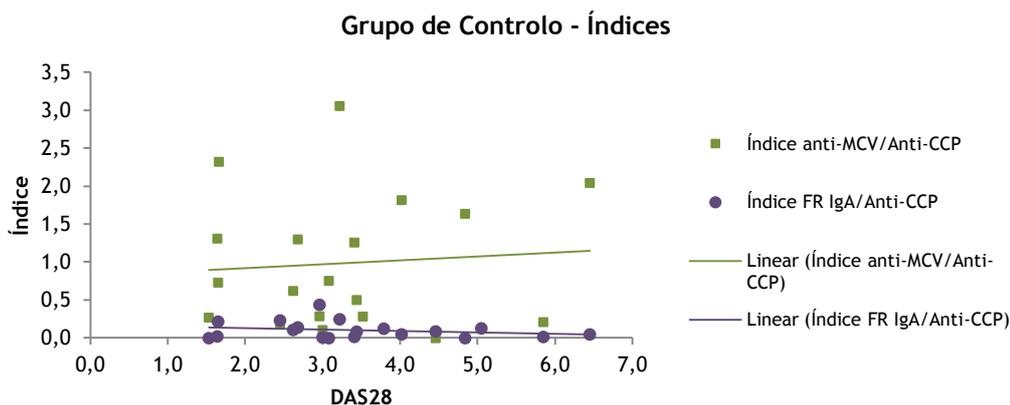


Gráfico 34. Correlação entre o DAS28 e os índices anti-MCV/anti-CCP e FR IgA/anti-CCP no grupo de controlo.

Como se pode observar pelo gráfico 34 e pelos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, 0,01 e 0,05 para os índices anticorpos anti-MCV/ anticorpos anti-CCP e FR IgA/ anticorpos anti-CCP no grupo de controlo, respetivamente, a correlação entre o DAS28 e estes índices não é clara.

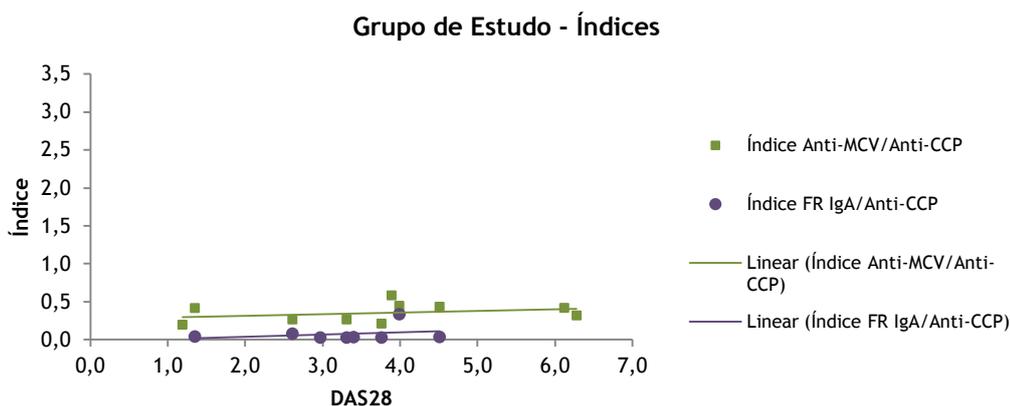


Gráfico 35. Correlação entre o DAS28 e os índices anti-MCV/anti-CCP e FR IgA/anti-CCP no grupo de estudo.

Como se pode observar pelo gráfico 35 e pelos coeficientes de correlação (R^2) obtidos, 0,09 e 0,07 para os índices anticorpos anti-MCV/ anticorpos anti-CCP e FR IgA/ anticorpos anti-CCP no grupo de estudo, respetivamente, a correlação entre o DAS28 e estes índices não é clara.

V. Discussão

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crónica sistémica, autoimune, com etiologia desconhecida e está associada com incapacidade progressiva, complicações sistémicas, morte prematura e elevados custos socioeconómicos ¹². A AR apresenta uma prevalência entre 0,5% e 1% da população, com três vezes mais preponderância nas mulheres do que nos homens e desenvolve-se entre os 40 anos e 70 anos. Neste estudo, ambos os grupos eram maioritariamente constituídos por mulheres. Não foi possível registar a idade média de diagnóstico da patologia, pois na maioria dos casos, essa informação não constava nos processos clínicos.

Na amostra de doentes analisada registou-se que todos os doentes de ambos os grupos se encontravam a fazer tratamento sintomático com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e/ou fármacos antirreumáticos modificadores da evolução da doença (DMARDs) e/ ou corticosteroides. Este perfil farmacoterapêutico está de acordo com as normas estabelecidas pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) para o tratamento da AR. Estas recomendações evidenciam a importância da prescrição de DMARDs logo após o diagnóstico da AR, numa fase precoce da doença. Neste sentido, recomenda-se que o metotrexato (MTX) seja incluído na primeira estratégia terapêutica, com o objetivo de garantir a remissão ou a diminuição da atividade da doença ⁹⁹. A prescrição de DMARDs clássicos foi observada em 63,6% e 100% dos doentes do grupo de estudo e do grupo de controlo, respetivamente, sendo que, a ausência de prescrição destes fármacos nos restantes doentes se deve à ocorrência de eventos adversos, como hepatotoxicidade, ou contra-indicação.

A Sociedade Portuguesa de Reumatologia (SPR) apresentou critérios consensuais para início e manutenção da terapêutica biológica na AR. Para início de terapêutica biológica os doentes com AR devem ter um DAS28 superior a 3,2, após pelo menos 3 meses de tratamento com MTX na dose de 20mg/semana, ou, na impossibilidade de tratamento com MTX nesta dose, após 6 meses de outro DMARD convencional ou associação terapêutica. Está previsto também o início de terapêutica biológica em doentes que, sob terapêuticas convencionais, apresentem um DAS28 entre 2,6 e 3,2 e tenham uma degradação funcional ou radiológica significativa ¹³⁷. No presente estudo clínico, não foi possível registar este tipo de informações.

As recomendações da EULAR definem os antagonistas do TNF- α , infliximab (IFX), etanercept (ETA), adalimumab (ADA), certolizumab pegol (CZP) e golimumab (GOL), como os fármacos biológicos de primeira linha para o tratamento da AR, em combinação com o MTX. Estas normas estipulam ainda que nos doentes com AR, para os quais este primeiro inibidor do TNF- α falhou, devem receber fármaco biológico da mesma classe, ou de classe diferente, como abatacept (ABT), rituximab (RTX) ou tocilizumabe (TCZ) ⁹⁹. Neste estudo, estes fármacos

constituíram a primeira linha de escolha por parte dos clínicos, sendo que, o adalimumab (ADA) foi o fármaco prescrito na maioria dos casos (54,5%), seguido do etanercept (ETA), golimumab (GOL) e infliximab (IFX). Registou-se a substituição do fármaco biológico em sete dos onze doentes (63,6%), sendo que destes, dois doentes mudaram para um agente com o alvo terapêutico distinto, RTX e TCZ. É ainda importante referir que três doentes descontinuaram o agente biológico devido a efeitos adversos, e num dos casos, por decisão do próprio doente. Não foi possível verificar em todos os doentes a administração de MTX em associação com o fármaco biológico, pela falta de registo clínicos.

O primeiro objetivo delineado para este projeto de investigação visava a comparação do *Disease Activity Score* (DAS28) e diferentes parâmetros laboratoriais de doentes com AR, que realizam tratamento convencional e tratamento com fármacos biológicos, avaliando a influência do tratamento nesses parâmetros. Torna-se pertinente salientar que o número de doentes analisados é pequeno, pelo que a validade destes resultados é baixa.

Como foi referido na introdução, a medição do DAS28 baseia-se no número de articulações afetadas, no valor da velocidade de sedimentação (VS) ou proteína C reativa (CRP) e no grau de comprometimento causado pela doença²⁷⁻²⁸.

Relativamente ao DAS28, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, o que sugere que ambos os tratamentos apresentam uma eficácia semelhante. De facto, a decisão médica associada à prescrição de um fármaco biológico reside, principalmente, na ausência de resposta clínica satisfatória aos fármacos convencionais, particularmente aos DMARDs, e ao agravamento da sintomatologia física do doente.

A análise comparativa dos parâmetros laboratoriais nos doentes com AR que efetuaram tratamento convencional e tratamento com agentes biológicos, revelou diferenças estatisticamente significativas em parâmetros hematológicos.

No que diz respeito aos glóbulos brancos, registou-se uma diminuição estatisticamente significativa do valor médio de leucócitos e do valor médio de neutrófilos entre o grupo de controlo e o grupo de estudo, sendo que os valores são menores no grupo de doentes com AR que efetuam terapêutica com fármacos biológicos. Uma das reações adversas mais comum observada com a terapêutica biológica é a imunossupressão¹⁸⁹⁻¹⁹⁰. Este fenómeno explica a diminuição do valor médio de leucócitos e neutrófilos neste grupo de doentes, uma vez que estes agentes modulam todo o sistema imunitário, comprometendo a ativação e proliferação de leucócitos. No entanto, os valores médios registados encontram-se dentro dos intervalos de referência definidos para cada parâmetro.

Na análise da série vermelha, apenas se observou diferença estatisticamente significativa no índice hematimétrico volume corpuscular médio (MCV), onde o valor médio foi menor nos

doentes com prescrição de agentes biológicos, apesar de ambos os valores se encontrarem dentro dos valores de referência definidos. Como foi referido na introdução, os doentes com AR exibem quadro clínicos de anemia, na maioria dos casos, do tipo normocítica e normocrômica, definida como anemia da doença crónica (ACD) ^{34,36}. Sabe-se que as citocinas pro-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 e IL-6 contribuem para o desenvolvimento da anemia da doença crónica, como consequência da diminuição da resposta à eritropoietina na medula óssea, levando à eritropoiese ineficaz ^{36,248}. No entanto, perturbações na homeostase do ferro, causadas pelo processo inflamatório, podem originar uma anemia por deficiência de ferro, do tipo microcítica ^{34,36}. Posto isto, seria de esperar que os doentes tratados com fármacos biológicos revelassem um aumento da hemoglobina e dos índices hematimétricos, particularmente do MCV. No entanto, os resultados obtidos contradizem o que está descrito na literatura. Esta discordância pode ser explicada pelo facto de nem todos os doentes do grupo de estudo efetuarem terapêutica biológica com antagonistas do TNF- α . Além disso, a amostra analisada é pequena e representativa apenas de uma região do país.

Relativamente ao valor médio da VS, apesar de não se terem observado diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, verifica-se que os valores se encontram acima dos valores de referência em ambos os grupos. A VS é um teste laboratorial que avalia o grau de agregação de eritrócitos por proteínas de fase aguda, tais como o fibrinogénio e imunoglobulinas ²⁴⁹. Este parâmetro tem sido utilizado para avaliar o nível de inflamação e monitorizar a progressão da doença. No entanto, a VS é um indicador inflamatório genérico, sendo que qualquer condição que leve a um aumento do fibrinogénio, como por exemplo, gravidez, diabetes, insuficiência renal, doença cardíaca, doenças vasculares, neoplasias e doenças crónicas, pode conduzir a um aumento da VS ²⁴⁹. De salientar que algumas destas condições, tais como, distúrbios cardiovasculares, constituem manifestações extra-articulares da AR, que resultam da inflamação sistémica que ocorre nesta patologia ³⁵. Assim, o aumento da VS pode ser devido diretamente ao processo patológico da AR, às suas consequências sistémicas ou a patologias concomitantes.

Nos restantes parâmetros hematológicos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos e os valores médios dos parâmetros encontram-se dentro dos intervalos de referência.

Relativamente aos parâmetros imunológicos, não foi possível analisar os valores de CRP, imunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) e fatores do complemento (C3 e C4) uma vez que os registos destes parâmetros imunológicos eram escassos. Nos parâmetros analisados, fator reumatoide (FR), FR IgA e IgG, anticorpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP) e anticorpos anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV), não foram registadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros analisados entre os dois grupos. No entanto, é importante referir que a quantificação destes parâmetros não foi efetuada de

forma regular e periódica, sendo que para a maior parte dos doentes apenas estavam disponíveis dois doseamentos nos processos clínicos e temporalmente bastante afastados, pelo que a validade e fiabilidade destes dados é baixa.

Neste projeto, não foi possível analisar os valores CRP, devido ao reduzido tamanho da amostra. A CRP é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios agudos e crónicos, incluindo infeções, queimaduras, traumatismos e outras condições inflamatórias. Nestas condições, as suas concentrações plasmáticas podem aumentar 100 vezes ou mais e apresenta um tempo de meia-vida curto, cerca de 5-7 horas²⁵⁰⁻²⁵¹. A utilidade deste parâmetro na monitorização da AR tem sido questionada, uma vez que para além de ser um marcador inflamatório inespecífico, um aumento da sua concentração em resposta a um estímulo é rapidamente repostado para os valores normais, sendo que apenas apresenta valor clínico se a sua quantificação for efetuada num intervalo de tempo muito próximo ao foco artrítico²⁵¹.

Uma característica da AR importante de salientar é a grande variabilidade interindividual observada nos doentes com esta patologia, quer do ponto de vista da evolução da mesma, como da resposta ao tratamento. Os sintomas na AR podem se desenvolver num curto espaço de tempo ou evoluir ao longo de muitas semanas ou meses e a progressão da doença pode ser muito rápida ou pontuada por remissões parciais ou completas de intervalos variáveis e imprevisíveis¹⁴⁻¹⁵.

De acordo com o que está descrito na literatura relativamente ao tratamento, a maioria dos grupos de doentes mostram uma grande variabilidade interindividual na resposta ao fármaco e na toxicidade. Esta variação pode ser devida a fatores genéticos, fisiológicos, fisiopatológicos, ou ambientais²⁵².

O acompanhamento e tratamento de doentes com AR é extremamente difícil. Os médicos e clínicos em geral enfrentam vários problemas, incluindo a falta de características clínicas e exames laboratoriais que permitam avaliar e prever com confiança a gravidade da doença ou fenótipo (por exemplo, manifestações extra-articulares). Além disso, a redução da sintomatologia física pode não alterar a evolução da doença, tal como erosões ósseas e a deformação da articulação²⁵².

Posto isto, de modo a demonstrar a variabilidade interindividual existente, procedeu-se à análise dos perfis de evolução do DAS28, da VS, contagem de leucócitos, eritrócitos e plaquetas ao longo do tempo, para cada doente de ambos os grupos, que são representativos da variabilidade interindividual descrita na literatura para os doentes com AR.

A análise do perfil de evolução do DAS28 dos doentes e o estudo detalhado de casos particulares permitiram observar a variabilidade interindividual em resposta a uma abordagem terapêutica semelhante e que um aumento deste *score* reflete não só a atividade global da AR, mas também a existência de patologias concomitantes, que afetam a VS. Além

disso, os quadros clínicos depressivos, frequentemente observados nestes doentes, têm um impacto negativo na sintomatologia da doença e afetam, por isso, a medição do DAS28.

Além disso, a evolução do DAS28 para cada doente apresenta variabilidade, isto é, pode ser muitas vezes marcada por progressões rápidas ou por remissões parciais da atividade da AR.

Apesar do DAS28 constituir a ferramenta mais objetiva disponível para a avaliação da evolução da AR e monitorização do tratamento, apresenta grandes limitações, uma vez que depende de parâmetros cuja avaliação é subjetiva e que podem facilmente ser influenciados por diferentes fatores. De realçar a avaliação feita pelo doente e a própria contagem das articulações afetadas e sensíveis que podem facilmente ser influenciadas pela componente psicológica do doente. Como se sabe, esta patologia é extremamente debilitante do ponto de vista físico e acarreta grandes limitações nas atividades do quotidiano dos seus portadores. Estes fatores geram complicações psicológicas graves nestes doentes. De facto, os doentes com AR frequentemente exibem quadros clínicos de depressões profundas, o que influencia de forma negativa a sintomatologia física inerente à AR e a sensibilidade à dor ²⁵³⁻²⁵⁴. Este é um dos principais fatores que tornam a avaliação clínica dos doentes com AR extremamente complexa e difícil, constituindo um dos principais obstáculos com que os médicos se deparam na avaliação destes doentes.

Relativamente aos perfis de evolução da VS, registou-se que, de uma forma geral, os doentes do grupo de estudo apresentam valores mais elevados do que os doentes do grupo controlo. Como já foi referido, este parâmetro tem sido utilizado para avaliar o nível de inflamação e monitorizar a progressão da doença, apesar de ser um indicador inflamatório inespecífico. O que se observou na análise dos perfis é que os valores de VS nem sempre refletem diretamente a atividade da AR. Como já foi discutido, patologias concomitantes com um padrão clínico inflamatório podem levar ao aumento da VS.

Os perfis de evolução do número de leucócitos, eritrócitos e plaquetas revelaram um padrão, dentro dos intervalos de referência para cada parâmetro, bem definido para a maioria dos doentes avaliados neste estudo. Não foram observadas diferenças notórias neste sentido entre os dois grupos analisados.

No entanto, pela análise prévia dos valores médios de leucócitos, registou-se uma diminuição estatisticamente significativa do valor médio de leucócitos entre o grupo de controlo e o grupo de estudo, sendo que os valores são menores no grupo de doentes com AR que efetuam terapêutica com fármacos biológicos. Como já foi discutido, esta alteração pode estar associada à imunossupressão, que é um dos efeitos adversos da terapêutica biológica.

Como já foi referido, o DAS28 constitui a ferramenta mais objetiva disponível para a avaliação da evolução da AR e monitorização do tratamento. Assim, partindo dos resultados analíticos e respetivas medições do DAS28 disponíveis, tentou-se correlacionar os parâmetros

hematológicos, VS e hemoglobina e os parâmetros imunológicos, anticorpos anti-CCP, anti-MCV e FR IgA.

Em relação à correlação do DAS28 com a VS observou-se que existe uma correlação positiva, isto é, estes parâmetros são diretamente proporcionais e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram 0,44 e 0,18 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente. No entanto, como já foi referido, todos os fatores que afetam diretamente a VS, vão afetar o cálculo do DAS28, uma vez que este é um dos parâmetros que entra na fórmula de cálculo deste *score*.

Na análise subsequentemente realizada, foram definidos quatro grupos, com base nos intervalos de DAS28: $DAS28 < 2,6$; $2,7 < DAS28 < 3,2$; $3,3 < DAS28 < 5,1$; $DAS28 > 5,2$, que correspondem respetivamente, à remissão da doença, baixa atividade, atividade moderada e elevada atividade da patologia. De uma forma geral observou-se que quanto maior a atividade da doença, maiores os valores de VS. Entre o grupo de controlo e o grupo de estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores de VS em cada um dos intervalos definidos pelos valores de DAS28.

A nível estatístico, foram observadas diferenças significativas dos valores de VS entre grupos de intervalos DAS28 no grupo de controlo e no grupo de estudo. A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre alguns grupos pode ser devida à reduzida amostra disponível nos mesmos. Isto é, era espectável a obtenção de diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos de valores de DAS28 para cada um dos grupos, pois quanto maior a atividade da doença, maiores os valores médios de VS.

Na bibliografia consultada não foram encontradas abordagens semelhantes. No entanto, como já foi referido, a VS é a única medida laboratorial incluída na medição do DAS28 e tem sido utilizada para avaliar o nível de inflamação e monitorizar a progressão da doença, pelo que um aumento neste parâmetro conduz a um aumento do *score* de atividade da doença. Com esta análise demonstrou-se a associação entre o DAS28 e a VS e é importante salientar a interdependência que estes parâmetros exibem. Por um lado, a determinação da VS por si só, apresenta fraca capacidade de monitorização da AR, pois é um marcador inflamatório inespecífico e, por outro lado, se este parâmetro não estivesse incluído na medição do DAS28, este resultaria apenas de medições cuja subjetividade é evidente.

Uma vez que se tem demonstrado uma associação entre o grau de anemia e um maior grau de atividade da AR ³⁶, procedeu-se a uma análise semelhante à anterior para os valores de hemoglobina. Nesta análise registou-se que existe uma correlação negativa entre o DAS28 e a hemoglobina, isto é, estes parâmetros são inversamente proporcionais e os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram 0,16 e 0,06 no grupo de controlo e no grupo de estudo, respetivamente.

Na análise deste parâmetro, à semelhança do anterior, definiram-se grupos dentro do grupo de controlo e do grupo de estudo, de acordo com os critérios de atividade da AR definidos. Assim, foram definidos quatro grupos correspondentes à remissão da doença, baixa atividade, atividade moderada e elevada atividade da patologia. De uma forma geral observou-se que quanto maior a atividade da doença, menores os valores de hemoglobina, sendo que ambos os grupos de controlo e de estudo apresentam valores de hemoglobina semelhantes entre os vários intervalos de valores de DAS28.

A nível estatístico, observou-se que existem diferenças estatisticamente significativas dos valores de hemoglobina entre os grupos de DAS28. Nesta perspetiva, este estudo apresentou algumas limitações em termos do número de quantificações de hemoglobina e respetivos DAS28 disponíveis. No entanto, os resultados observados sugerem que um estudo mais alargado pode revelar resultados estatisticamente significativos, apesar dos valores médios de hemoglobina obtidos para cada grupo se encontrarem dentro dos valores de referência.

Na bibliografia consultada, não foram encontradas abordagens semelhantes, nomeadamente no que diz respeito à avaliação dos níveis de hemoglobina em doentes com AR. No entanto, como foi previamente referido, tem-se demonstrado uma associação entre o grau de anemia e um maior grau de atividade da AR ³⁶.

Relativamente à análise dos parâmetros imunológicos, FR, FR IgA e IgM, anticorpos anti-CCP, e anti-MCV, é evidente a disparidade entre os valores máximos e mínimos. No entanto, todos os doentes apresentam positividade para o FR e/ou para os anticorpos anti-CCP, que são duas importantes ferramentas para o diagnóstico da AR.

Apesar do escasso número de determinações analíticas disponíveis, as correlações fracas observadas nestas análises ($< 0,20$), sugerem que estes parâmetros não apresentam capacidade de prognóstico da doença e monitorização da terapêutica.

De facto, de acordo com a bibliografia consultada, apesar de alguns autores referirem que o FR IgA e os anticorpos anti-MCV apresentam uma relação com a atividade da doença e que o FR IgA e IgM e os anticorpos anti-CCP estão associados com manifestações extra-articulares ⁷⁴, a generalidade dos autores e respetivos estudos referem que estes parâmetros apenas têm validade para o diagnóstico da AR e para a previsão da progressão erosiva da doença ^{25-26,255}. A capacidade de prognóstico e de monitorização da terapêutica através destes parâmetros ainda não foi demonstrada.

VI. Conclusões

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica, autoimune, com etiologia desconhecida e está associada com incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte prematura e elevados custos socioeconômicos. Os fármacos biológicos emergiram como uma solução promissora para diminuir os sintomas clínicos dos doentes com esta patologia e melhorar a sua qualidade de vida. No entanto, este tipo de terapêutica implica elevados custos e está associada ao aparecimento de efeitos adversos significativos e em muito casos revela-se ineficaz.

O *Disease Activity Score* (DAS28), apesar de ser a ferramenta clínica amplamente utilizada para a avaliação clínica do doente e para a monitorização da terapêutica utilizada, apresenta graves limitações e a sua utilidade têm sido, por isso, muito questionada. A medição do DAS28 baseia-se no número de articulações afetadas e no grau de comprometimento causado pela doença, que são parâmetros cuja avaliação é subjetiva e pode ser fortemente afetada por outros fatores. Na medição deste score entra também a quantificação do valor da velocidade de sedimentação (VS) ou proteína C reativa (CRP), que são os únicos parâmetros de quantificação laboratorial. No entanto, devido à sua baixa especificidade para a AR, também estes limitam a forma como a avaliação dos doentes é realizada.

A análise dos perfis de evolução do DAS28 e da VS ao longo do tempo permitiram demonstrar que a variabilidade interindividual nos doentes com AR é elevada, quer do ponto de vista da evolução da patologia, como da resposta a um mesmo tratamento, o que pressupõe a prática de uma “medicina personalizada”, adaptável a cada doente. Os estudos farmacogenéticos visam identificar fatores genéticos, serológicos e clínicos que permitam definir o perfil individual de um doente para possibilitar delinear o tratamento mais apropriado e podem vir a melhorar muito a prática clínica nesta patologia.

Na análise da correlação entre parâmetros, é evidente a associação entre o DAS28 e a VS. No entanto, estes parâmetros exibem uma interdependência elevada, pelas limitações que apresentam. Relativamente à correlação entre o DAS28 e os valores de hemoglobina, a associação não é clara, sendo que são, por isso, necessários estudos adicionais.

Relativamente aos parâmetros imunológicos e à sua correlação com o DAS28, os resultados sugerem que estes parâmetros não apresentam capacidade de prognóstico da doença e monitorização da terapêutica. Estes parâmetros apenas têm validade para o diagnóstico da AR e para a previsão da progressão erosiva da doença.

No presente projeto de investigação concluiu-se que a terapêutica convencional e a terapêutica biológica apresentam uma eficácia semelhante, nomeadamente no que diz

respeito à avaliação do DAS28 e também à generalidade dos parâmetros laboratoriais analisados. No entanto, no que diz respeito à sintomatologia física da AR, o tratamento com fármacos biológicos conduz a melhorias significativas, com um aumento global da qualidade de vida dos doentes.

VII. Perspetivas Futuras

A avaliação dos doentes com Artrite Reumatoide (AR) é muito complexa, quer do ponto de vista do diagnóstico e prognóstico, como da monitorização da terapêutica aplicada, devido à ausência de um *gold standard* ou de parâmetros laboratoriais clínicos para definir a patologia.

Existe, por isso, uma necessidade crescente de encontrar um biomarcador que apresente, não só, capacidade de prognóstico e de previsão de evolução da doença, mas que permita também monitorizar de uma forma eficaz o tratamento, nomeadamente com fármacos biológicos, pois estão associados a elevados custos e efeitos adversos significativos. Na monitorização do tratamento salienta-se a importância de prever a falha deste, a necessidade de optar por uma abordagem terapêutica diferente e de avaliar sua eficácia clínica.

Neste sentido, novos parâmetros laboratoriais têm sido investigados, nomeadamente a quantificação dos níveis séricos de fármaco e de anticorpos antifármaco, a avaliação dos níveis de metaloproteínas, entre outros.

Deste modo, torna-se pertinente a realização de ensaios clínicos para avaliar se estes parâmetros apresentam valor preditivo para monitorizar a terapêutica e a evolução da AR e avaliar as vantagens e desvantagens de os introduzir na rotina laboratorial.

VIII. Referências Bibliográficas

- 1 Rede de Referenciação Hospitalar de Reumatologia, R. R. H. Direcção dos Serviços de Planeamento. *Direcção-Geral de Saúde. Ministério da Saúde* (2002).
- 2 Fransen, J. & van Riel, P. Outcome measures in inflammatory rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* **11**, 244 (2009).
- 3 Seeley, R. R., Stephens, T. D. & Tate, P. *Essentials of anatomy & physiology*. (Mosby, 1995).
- 4 Van De Graaff, K. M. *Human anatomy*. (William C. Brown, 2001).
- 5 Sambrook, P., Schrieber, L., Taylor, T. & Ellis, A. *The musculoskeletal system - Basis Science and Clinical Conditions*. (Churchill Livingstone, 2001).
- 6 Espanha, M. M. [Articular cartilage: structure and histochemical composition]. *Acta Reumatol Port* **35**, 424-433 (2010).
- 7 Mow, V. C., Ratcliffe, A. & Poole, A. R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**, 67-97 (1992).
- 8 Diab, M. The role of type IX collagen in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Orthop Rev* **22**, 165-170 (1993).
- 9 Kempson, G. E., Muir, H., Pollard, C. & Tuke, M. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* **297**, 456-472 (1973).
- 10 Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P. & Roughley, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 351-384 (2008).
- 11 Muir, H. The chemistry of the ground substance of joint cartilage. *The joints and synovial fluid* **2**, 27-94 (1980).
- 12 Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356-361 (2003).
- 13 Hochberg, M. C., Silman, A. J., Smolen, J. S., Weinblatt, M. E. & Weisman, M. H. *Rheumatoid Arthritis*. (2009).
- 14 Malottki, K. *et al.* Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **15**, 1-278 (2011).
- 15 Jacoby, R., Jayson, M. & Cosh, J. Onset, early stages, and prognosis of rheumatoid arthritis: a clinical study of 100 patients with 11-year follow-up. *British medical journal* **2**, 96-100 (1973).

- 16 Wiles, N. *et al.* Benchmarking: the five year outcome of rheumatoid arthritis assessed using a pain score, the Health Assessment Questionnaire, and the Short Form-36 (SF-36) in a community and a clinic based sample. *Annals of the rheumatic diseases* **60**, 956-961 (2001).
- 17 Symmons, D. *et al.* The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology* **41**, 793-800 (2002).
- 18 Monjardino, T., Lucas, R. & Barros, H. Frequency of rheumatic diseases in Portugal: a systematic review. *Acta reumatológica portuguesa* **36**, 336 (2011).
- 19 Sokolove, J. & Strand, V. Rheumatoid arthritis classification criteria - It's finally time to move on! *Bull NYU Hosp Jt Dis* **68**, 232-238 (2010).
- 20 Bennett, G., Cobb, S., Jacox, R., Jessar, R. & Ropes, M. Proposed diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bulletin on the rheumatic diseases* **7**, 121 (1956).
- 21 Ropes, M. W., Bennett, G. A., Cobb, S., Jacox, R. & Jessar, R. A. 1958 revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **2**, 16-20 (2006).
- 22 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **31**, 315-324 (2005).
- 23 Bennett, P. & Burch, T. New York symposium on population studies in the rheumatic diseases: new diagnostic criteria. *Bull Rheum Dis* **17**, 453 (1967).
- 24 Jacobsson, L. T. H. *et al.* A cross-sectional and longitudinal comparison of the rome criteria for active rheumatoid arthritis (equivalent to the american college of rheumatology 1958 criteria) and the american college of rheumatology 1987 criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **37**, 1479-1486 (2005).
- 25 Neogi, T. *et al.* The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum* **62**, 2582-2591 (2010).
- 26 Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* **62**, 2569-2581 (2010).
- 27 DAS - Score. NL, *Disease Activity Score in Rheumatoid Arthritis*, <<http://www.das-score.nl/>> (acedido em Julho de 2013).
- 28 van der Heijde, D. M., van 't Hof, M., van Riel, P. L. & van de Putte, L. B. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* **20**, 579-581 (1993).
- 29 HAQ. ARAMIS: HAQ, *The Health Assessment Questionnaire*, <<http://aramis.stanford.edu/HAQ.html>> (acedido em Julho de 2013).
- 30 Bruce, B. & Fries, J. F. The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual Life Outcomes* **1**, 20 (2003).
- 31 Bruce, B. & Fries, J. F. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol* **30**, 167-178 (2003).

- 32 Pincus, T. Advantages and limitations of quantitative measures to assess rheumatoid arthritis: joint counts, radiographs, laboratory tests, and patient questionnaires. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **64**, 32-39 (2006).
- 33 Ngian, G. S. Rheumatoid arthritis. *Aust Fam Physician* **39**, 626-628 (2010).
- 34 Rindfleisch, J. A. & Muller, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician* **72**, 1037-1047 (2005).
- 35 McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* **365**, 2205-2219 (2011).
- 36 Swaak, A. Anemia of chronic disease in patients with rheumatoid arthritis: aspects of prevalence, outcome, diagnosis, and the effect of treatment on disease activity. *J Rheumatol* **33**, 1467-1468 (2006).
- 37 Baer, A. N., Dessypris, E. N. & Krantz, S. B. The pathogenesis of anemia in rheumatoid arthritis: a clinical and laboratory analysis. *Semin Arthritis Rheum* **19**, 209-223 (1990).
- 38 Hansen, N. E. The anaemia of chronic disorders. A bag of unsolved questions. *Scand J Haematol* **31**, 397-402 (1983).
- 39 Peeters, H. R. *et al.* Course and characteristics of anaemia in patients with rheumatoid arthritis of recent onset. *Ann Rheum Dis* **55**, 162-168 (1996).
- 40 Remacha, A. F. *et al.* Erythroid abnormalities in rheumatoid arthritis: the role of erythropoietin. *J Rheumatol* **19**, 1687-1691 (1992).
- 41 Vreugdenhil, G., Wognum, A. W., van Eijk, H. G. & Swaak, A. J. Anaemia in rheumatoid arthritis: the role of iron, vitamin B12, and folic acid deficiency, and erythropoietin responsiveness. *Ann Rheum Dis* **49**, 93-98 (1990).
- 42 Cartwright, G. E. & Lee, G. R. The anaemia of chronic disorders. *Br J Haematol* **21**, 147-152 (1971).
- 43 Weiss, G. & Goodnough, L. T. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* **352**, 1011-1023 (2005).
- 44 Pincus, T. & Sokka, T. Prevalence of normal erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) on presentation of patients with rheumatoid arthritis (RA) at two rheumatology settings, one in the US and the other in Finland: Is a patient questionnaire a better quantitative measure of clinical severity? *Arthritis Rheum* **52** [9]: S127 (2005).
- 45 Wolfe, F. & Michaud, K. The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate. *J Rheumatol* **21**, 1227-1237 (1994).
- 46 Wolfe, F. & Pincus, T. The level of inflammation in rheumatoid arthritis is determined early and remains stable over the longterm course of the illness. *J Rheumatol* **28**, 1817-1824 (2001).
- 47 Waaler, E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS* **115**, 422-438; discussion 439 (2007).

- 48 Jones, V., Taylor, P. C., Jacoby, R. K. & Wallington, T. B. Synovial synthesis of rheumatoid factors and immune complex constituents in early arthritis. *Ann Rheum Dis* **43**, 235-239 (1984).
- 49 Wernick, R. M. *et al.* IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum* **28**, 742-752 (1985).
- 50 Nell, V. P. *et al.* Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 1731-1736 (2005).
- 51 Mimori, T. Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. *Intern Med* **44**, 1122-1126 (2005).
- 52 Nienhuis, R. L. & Mandema, E. A NEW SERUM FACTOR IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS; THE ANTIPERINUCLEAR FACTOR. *Ann Rheum Dis* **23**, 302-305 (1964).
- 53 Hoet, R. M., Boerbooms, A. M., Arends, M., Ruiters, D. J. & van Venrooij, W. J. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* **50**, 611-618 (1991).
- 54 Young, B. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D., Clark, C. J. & Hamblin, T. J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* **2**, 97-99 (1979).
- 55 Aggarwal, R., Liao, K., Nair, R., Ringold, S. & Costenbader, K. H. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **61**, 1472-1483 (2009).
- 56 Sebbag, M. *et al.* The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* **95**, 2672-2679 (1995).
- 57 Baeten, D. *et al.* Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* **44**, 2255-2262 (2001).
- 58 Nogueira, L. *et al.* Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **60**, 882-887 (2001).
- 59 Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. & van Venrooij, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* **101**, 273-281 (1998).
- 60 Vincent, C. *et al.* Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46**, 2051-2058 (2002).
- 61 Girbal-Neuhausser, E. *et al.* The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* **162**, 585-594 (1999).

- 62 Vossenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J. & Pruijn, G. J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* **25**, 1106-1118 (2003).
- 63 Lee, D. M. & Schur, P. H. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **62**, 870-874 (2003).
- 64 Schellekens, G. A. *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* **43**, 155-163, doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3 [doi] (2000).
- 65 Suzuki, K. *et al.* High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* **32**, 197-204 (2003).
- 66 van Venrooij, W. J., van Beers, J. J. & Pruijn, G. J. Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci* **1143**, 268-285 (2008).
- 67 Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D. & Tozzoli, R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* **47**, 1089-1093 (2001).
- 68 Palosuo, T., Tilvis, R., Strandberg, T. & Aho, K. Filaggrin related antibodies among the aged. *Ann Rheum Dis* **62**, 261-263 (2003).
- 69 van Venrooij, W. J., Hazes, J. M. & Visser, H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* **60**, 383-388 (2002).
- 70 Vossenaar, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* **6**, R142-150 (2004).
- 71 Despres, N., Boire, G., Lopez-Longo, F. J. & Menard, H. A. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **21**, 1027-1033 (1994).
- 72 Hayem, G. *et al.* Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **26**, 7-13 (1999).
- 73 Hueber, W., Hassfeld, W., Smolen, J. S. & Steiner, G. Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 155-159 (1999).
- 74 Egerer, K., Feist, E. & Burmester, G. R. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int* **106**, 159-163 (2009).
- 75 Kuna, A. T. Mutated citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* **413**, 66-73 (2012).
- 76 Klareskog, L., Rönnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L. & Alfredsson, L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 651-675 (2008).
- 77 MacGregor, A. J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* **43**, 30-37 (2000).

- 78 MacGregor, A. J. *et al.* Heterogeneity of disease phenotype in monozygotic twins concordant for rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **34**, 215-220 (1995).
- 79 Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-678 (2007).
- 80 Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **30**, 1205-1213 (1987).
- 81 Vessey, M., Villard-Mackintosh, L. & Yeates, D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* **35**, 457-464 (1987).
- 82 Uhlig, T., Hagen, K. & Kvien, T. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **26**, 47 (1999).
- 83 Symmons, D. P. M. *et al.* Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis. Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis & Rheumatism* **40**, 1955-1961 (1997).
- 84 Heliövaara, M., Aho, K., Aromaa, A., Knekt, P. & Reunanen, A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **20**, 1830 (1993).
- 85 Tuomi, T., Heliövaara, M., Palosuo, T. & Aho, K. Smoking, lung function, and rheumatoid factors. *Annals of the rheumatic diseases* **49**, 753-756 (1990).
- 86 Molina, V. & Shoenfeld, Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* **38**, 235-245 (2005).
- 87 Carty, S. M., Snowden, N. & Silman, A. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Annals of the rheumatic diseases* **63**, ii46-ii49 (2004).
- 88 Holmdahl, R. *et al.* Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunological reviews* **184**, 184-202 (2001).
- 89 Pearson, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **91**, 95-101 (1956).
- 90 Hughes, R., Allard, S. & Maini, R. Arthritis associated with adjuvant mycobacterial treatment for carcinoma of the bladder. *Annals of the rheumatic diseases* **48**, 432-434 (1989).
- 91 Torisu, M., Miyahara, T., Shinohara, N., Ohsato, K. & Sonozaki, H. A new side effect of BCG immunotherapy—BCG-induced arthritis in man. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **5**, 77-83 (1978).
- 92 Kamphuis, S. *et al.* Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet* **366**, 50-56 (2005).
- 93 Auger, I. & Roudier, J. A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK. Implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 1818 (1997).
- 94 Feder Jr, H. M. *et al.* A critical appraisal of “chronic Lyme disease”. *New England Journal of Medicine* **357**, 1422-1430 (2007).

- 95 Steere, A. C. *et al.* The spirochetal etiology of Lyme disease. *New England Journal of Medicine* **308**, 733-740 (1983).
- 96 Liao, K. P., Alfredsson, L. & Karlson, E. W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* **21**, 279 (2009).
- 97 Goldbach-Mansky, R. & Lipsky, P. E. New Concepts in the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. *Annual review of medicine* **54**, 197-216 (2003).
- 98 Rudolf, M. *et al.* Rheumatoid Arthritis: National clinical guideline for management and treatment in adults. *Royal College of Physicians* (2009).
- 99 Smolen, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* **69**, 964-975 (2010).
- 100 Christie, A. *et al.* Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews. *Phys Ther* **87**, 1697-1715 (2007).
- 101 Heiberg, T. & Kvien, T. K. Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: pain has highest priority. *Arthritis Care & Research* **47**, 391-397 (2002).
- 102 Bijlsma, J., Boers, M., Saag, K. & Furst, D. Glucocorticoids in the treatment of early and late RA. *Annals of the rheumatic diseases* **62**, 1033-1037 (2003).
- 103 Hoes, J. *et al.* EULAR evidence-based recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases* **66**, 1560-1567 (2007).
- 104 Kirwan, J. R., Bijlsma, J., Boers, M. & Shea, B. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* **1** (2007).
- 105 Kemper, A. R., Van Mater, H. A., Coeytaux, R. R., Williams, J. W., Jr. & Sanders, G. D. Systematic review of disease-modifying antirheumatic drugs for juvenile idiopathic arthritis. *BMC Pediatr* **12**, 29 (2012).
- 106 Kremer, J. M. Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine* **134**, 695 (2001).
- 107 Wood, A. J. J. & O'Dell, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* **350**, 2591-2602 (2004).
- 108 Choy, E. H. & Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **344**, 907-916 (2001).
- 109 Agarwal, S. K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* **17**, S14-18 (2011).
- 110 Lee, D. M. & Weinblatt, M. E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **358**, 903-911 (2001).
- 111 Gravallese, E. M., Darling, J. M., Ladd, A. L., Katz, J. N. & Glimcher, L. H. In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **34**, 1076-1084 (1991).

- 112 McCachren, S. S., Haynes, B. F. & Niedel, J. E. Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol* **10**, 19-27 (1990).
- 113 Shiozawa, S., Shiozawa, K. & Fujita, T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum* **26**, 472-478 (1983).
- 114 Kobayashi, I. & Ziff, M. Electron microscopic studies of the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **18**, 475-483 (1975).
- 115 Schneider, F. [AA-amyloidosis in inflammatory rheumatic diseases. A report of clinical experiences]. *Z Rheumatol* **51**, 177-182 (1992).
- 116 Holmqvist, M. *et al.* Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *Journal of internal medicine* **268**, 578-585 (2010).
- 117 Solomon, D. H. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* **107**, 1303-1307 (2003).
- 118 Wolfe, F. *et al.* The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **37**, 481-494 (1994).
- 119 Sattar, N. & McInnes, I. B. Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. *Current opinion in rheumatology* **17**, 286 (2005).
- 120 Kaptoge, S. *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* **375**, 132 (2010).
- 121 Choy, E. & Sattar, N. Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions. *Annals of the rheumatic diseases* **68**, 460-469 (2009).
- 122 Choi, H. K., Hernán, M. A., Seeger, J. D., Robins, J. M. & Wolfe, F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *The Lancet* **359**, 1173-1177 (2002).
- 123 Jacobsson, L. T. H. *et al.* Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* **32**, 1213-1218 (2005).
- 124 McKellar, G. E., McCarey, D. W., Sattar, N. & McInnes, I. B. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology* **6**, 410-417 (2009).
- 125 Zhang, C. *et al.* Increased serum levels of beta(2)-GPI-Lp(a) complexes and their association with premature atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* **412**, 1332-1336 (2011).
- 126 Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Biotechnology* **24**, 524-526 (1992).

- 127 Shirota, Y., Illei, G. G. & Nikolov, N. P. Biologic treatments for systemic rheumatic diseases. *Oral Dis* **14**, 206-216 (2008).
- 128 Feldmann, M. & Maini, R. N. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us? *J Immunol* **185**, 791-794 (2010).
- 129 Feldmann, M., Brennan, F. M. & Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **14**, 397-440 (1996).
- 130 Simsek, I. TNF inhibitors - new and old agents for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **68**, 204-210 (2010).
- 131 Brennan, F. M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. & Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**, 244-247 (1989).
- 132 Haworth, C. *et al.* Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* **21**, 2575-2579 (1991).
- 133 Williams, R. O., Feldmann, M. & Maini, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9784-9788 (1992).
- 134 O'Dell, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **350**, 2591-2602 (2004).
- 135 Kuek, A., Hazleman, B. L. & Ostor, A. J. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgrad Med J* **83**, 251-260 (2007).
- 136 Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. & Tak, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **117**, 244-279 (2008).
- 137 Fonseca, J. E. *et al.* Portuguese guidelines for the use of biological agents in rheumatoid arthritis - October 2011 update. *Acta Reumatol Port* **36**, 385-388 (2011).
- 138 Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670 (1975).
- 139 Brennan, F. M. & McInnes, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **118**, 3537-3545 (2008).
- 140 Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H. & Shimoda, T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 1215-1228 (2010).
- 141 Aringer, M. & Smolen, J. S. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **10**, 202 (2008).
- 142 McDevitt, H., Munson, S., Ettinger, R. & Wu, A. Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**, S141-152 (2002).

- 143 Bradham, C. A., Plumpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A. & Trautwein, C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* **275**, G387-392 (1998).
- 144 Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65 (2003).
- 145 Feldmann, M. & Steinman, L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* **435**, 612-619 (2005).
- 146 Cantaert, T., Baeten, D., Tak, P. P. & van Baarsen, L. G. Type I IFN and TNFalpha cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. *Arthritis Res Ther* **12**, 219 (2010).
- 147 Feldmann, M. & Maini, R. N. Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine* **69**, 12-18 (2002).
- 148 Tak, P. P. *et al.* Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* **40**, 217-225 (1997).
- 149 Mewar, D. & Wilson, A. G. Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *Br J Pharmacol* **162**, 785-791 (2011).
- 150 Knight, D. M. *et al.* Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* **30**, 1443-1453 (1993).
- 151 Siegel, S. A. *et al.* The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine* **7**, 15-25 (1995).
- 152 Barone, D., Krantz, C., Lambert, D., Maggiora, K. & Mohler, K. Comparative analysis of the ability of etanercept and infliximab to lyse TNF-expressing cells in a complement dependent fashion. *Arthritis Rheum* **42**, S90 (1999).
- 153 Harriman, G., Harper, L. K. & Schaible, T. F. Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann Rheum Dis* **58 Suppl 1**, I61-64 (1999).
- 154 Mohler, K. M. *et al.* Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* **151**, 1548-1561 (1993).
- 155 Fonseca, J. E. *et al.* Recomendações para diagnóstico e tratamento da tuberculose latente e activa nas doenças inflamatórias articulares candidatas a tratamento com fármacos inibidores do factor de necrose tumoral alfa. *Revista Portuguesa de Pneumologia* **12**, 603-613 (2006).
- 156 Wong, M. *et al.* TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* **126**, 121-136 (2008).
- 157 Shen, C. *et al.* Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther* **21**, 251-258 (2005).
- 158 Pappas, D. A., Geraldino-Pardilla, L. & Bathon, J. M. Immune modulation of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **25**, 873-889 (2011).

- 159 Dayer, J. M. & Choy, E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 15-24 (2010).
- 160 Maini, R. N. *et al.* Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum* **54**, 2817-2829 (2006).
- 161 Eastgate, J. A. *et al.* Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2**, 706-709 (1988).
- 162 Furst, D. E. Anakinra: review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Ther* **26**, 1960-1975 (2004).
- 163 Kukar, M., Petryna, O. & Efthimiou, P. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Biologics* **3**, 443-457 (2009).
- 164 Chang, J. & Kavanaugh, A. Novel therapies for rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* **12**, 217-225 (2005).
- 165 Dorner, T. & Burmester, G. R. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 246-252 (2003).
- 166 Takemura, S., Klimiuk, P. A., Braun, A., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* **167**, 4710-4718 (2001).
- 167 van Zeben, D. *et al.* Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis* **51**, 1029-1035 (1992).
- 168 Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**, 443-446 (2000).
- 169 Reff, M. E. *et al.* Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**, 435-445 (1994).
- 170 Leandro, M. J. & Becerra-Fernandez, E. B-cell therapies in established rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **25**, 535-548 (2011).
- 171 Finckh, A. *et al.* B cell depletion may be more effective than switching to an alternative anti-tumor necrosis factor agent in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to anti-tumor necrosis factor agents. *Arthritis Rheum* **56**, 1417-1423 (2007).
- 172 Finckh, A. *et al.* Which subgroup of patients with rheumatoid arthritis benefits from switching to rituximab versus alternative anti-tumour necrosis factor (TNF) agents after previous failure of an anti-TNF agent? *Ann Rheum Dis* **69**, 387-393 (2010).
- 173 Vander Cruyssen, B. *et al.* The Belgian MIRA (MabThera In Rheumatoid Arthritis) registry: clues for the optimization of rituximab treatment strategies. *Arthritis Res Ther* **12**, R169 (2010).
- 174 Smolen, J. S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M. H. & Emery, P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* **370**, 1861-1874 (2007).

- 175 Linsley, P. S. *et al.* CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**, 561-569 (1991).
- 176 Collins, A. V. *et al.* The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**, 201-210 (2002).
- 177 Salomon, B. & Bluestone, J. A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* **19**, 225-252 (2001).
- 178 Khraishi, M. Comparative overview of safety of the biologics in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* **82**, 25-32 (2009).
- 179 Caporali, R. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with anti-TNF-alpha agents: a reappraisal. *Autoimmun Rev* **8**, 274-280 (2009).
- 180 van Vollenhoven, R. F. Switching between biological agents. *Clin Exp Rheumatol* **22**, S115-121 (2004).
- 181 Cohen, S. B. *et al.* Continued inhibition of structural damage over 2 years in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in combination with methotrexate. *Ann Rheum Dis* **69**, 1158-1161 (2010).
- 182 Keystone, E. *et al.* Rituximab inhibits structural joint damage in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* **68**, 216-221 (2009).
- 183 Cohen, S. B. *et al.* Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis & Rheumatism* **54**, 2793-2806 (2006).
- 184 Edwards, J. C. W. *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* **350**, 2572-2581 (2004).
- 185 Emery, P. *et al.* The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* **54**, 1390-1400 (2006).
- 186 Bresnihan, B. & Cobby, M. Clinical and radiological effects of anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42 Suppl 2**, ii22-28 (2003).
- 187 Jiang, Y. *et al.* A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* **43**, 1001-1009 (2000).
- 188 Genovese, M. C. *et al.* Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med* **353**, 1114-1123 (2005).
- 189 Descotes, J. & Gouraud, A. Clinical immunotoxicity of therapeutic proteins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1537-1549 (2008).

- 190 Atzeni, F. *et al.* Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* (2012).
- 191 Askling, J. & Dixon, W. The safety of anti-tumour necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **20**, 138-144 (2008).
- 192 Carbone, J., Perez-Rojas, J. & Sarmiento, E. Infectious pulmonary complications in patients treated with anti-TNF-alpha monoclonal antibodies and soluble TNF receptor. *Curr Infect Dis Rep* **11**, 229-236 (2009).
- 193 Garcia-Vidal, C. & Salavert, M. Infections in patients treated with TNF-alfa antagonists. *Revista International Clinical Medicine. Barcelona, Espanha* **2** (2009).
- 194 Imperato, A. K., Bingham, C. O., 3rd & Abramson, S. B. Overview of benefit/risk of biological agents. *Clin Exp Rheumatol* **22**, S108-114 (2004).
- 195 Desai, S. B. & Furst, D. E. Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 757-790 (2006).
- 196 Elezoglou, A. *et al.* Infliximab treatment-induced formation of autoantibodies is common in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* **25**, S65-69 (2007).
- 197 Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P., Soto, M. J., Cuadrado, M. J. & Khamashta, M. A. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 847-861 (2008).
- 198 Kimby, E. Tolerability and safety of rituximab (MabThera). *Cancer Treat Rev* **31**, 456-473 (2005).
- 199 Oldfield, V., Dhillon, S. & Plosker, G. L. Tocilizumab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* **69**, 609-632 (2009).
- 200 Nakamura, I., Omata, Y., Naito, M. & Ito, K. Blockade of interleukin 6 signaling induces marked neutropenia in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **36**, 459-460 (2009).
- 201 Dayer, J. M., Feige, U., Edwards, C. K., 3rd & Burger, D. Anti-interleukin-1 therapy in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* **13**, 170-176 (2001).
- 202 Mertens, M. & Singh, J. A. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* **36**, 1118-1125 (2009).
- 203 Fleischmann, R. M. Addressing the safety of anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42 Suppl 2**, ii29-35 (2003).
- 204 Westhovens, R. *et al.* Safety and efficacy of the selective costimulation modulator abatacept in patients with rheumatoid arthritis receiving background methotrexate: a 5-year extended phase IIB study. *J Rheumatol* **36**, 736-742 (2009).
- 205 Atzeni, F. & Sarzi-Puttini, P. Autoantibody production in patients treated with anti-TNF-alpha. *Expert Rev Clin Immunol* **4**, 275-280 (2008).
- 206 Cassinotti, A. & Travis, S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 1264-1275 (2009).

- 207 Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Gorla, R., Marchesoni, A. & Caporali, R. Switching rheumatoid arthritis treatments: an update. *Autoimmun Rev* **10**, 397-403 (2011).
- 208 Bendtzen, K., Ainsworth, M., Steenholdt, C., Thomsen, O. O. & Brynskov, J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Scand J Gastroenterol* **44**, 774-781 (2009).
- 209 Pallavicini, F. B. *et al.* Tumour necrosis factor antagonist therapy and cancer development: analysis of the LORHEN registry. *Autoimmun Rev* **9**, 175-180 (2010).
- 210 Chaparro, M., Guerra, I., Munoz-Linares, P. & Gisbert, J. P. Systematic review: antibodies and anti-TNF-alpha levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2012).
- 211 Emi Aikawa, N., de Carvalho, J. F., Artur Almeida Silva, C. & Bonfa, E. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* **38**, 82-89 (2010).
- 212 Klareskog, L. *et al.* Etanercept Study 301 Investigators. Assessment of long-term safety and efficacy of etanercept in a 5-year extension study in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* **29** (2011).
- 213 Benucci, M. *et al.* Lack of correlation between the development of IgA and IgM specific antibodies to anti-TNF blocking agents, disease activity and adverse side reactions in a longitudinal study of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **70**(Suppl. 3):120 (2011).
- 214 Thurlings, R. M. *et al.* Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**, 409-412 (2010).
- 215 Desroches, M., Louis, G., Gleizes, A., Krzysiek, R. & Emilie, D. Treatment failure with antagonists of TNF-alpha: mechanisms and implications for the care of patients. *Eur Cytokine Netw* **21**, 226-231 (2010).
- 216 Mulleman, D. *et al.* Should anti-TNF-alpha drug levels and/or anti-drug antibodies be assayed in patients treated for rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* **79**, 109-112 (2012).
- 217 St Clair, E. W. *et al.* The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **46**, 1451-1459 (2002).
- 218 Maini, R. N. *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 1552-1563 (1998).
- 219 Keystone, E. C. *et al.* Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **50**, 353-363 (2004).

- 220 Weisman, M. H. *et al.* Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther* **25**, 1700-1721 (2003).
- 221 Wolbink, G. J. *et al.* Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 704-707 (2005).
- 222 Bartelds, G. M. *et al.* Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **66**, 921-926 (2007).
- 223 Jamnitski, A. *et al.* Patients non-responding to etanercept obtain lower etanercept concentrations compared with responding patients. *Ann Rheum Dis* **71**, 88-91 (2012).
- 224 Lee, H. *et al.* Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of etanercept using logistic regression analysis. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 348-365 (2003).
- 225 Wolbink, G. J. *et al.* Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 711-715 (2006).
- 226 Ternant, D. *et al.* Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients. *Therapeutic drug monitoring* **30**, 523-529 (2008).
- 227 Xu, Z. *et al.* Population pharmacokinetics of infliximab in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of Clinical Pharmacology* **48**, 681-695 (2008).
- 228 Bendtzen, K. *et al.* Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum* **54**, 3782-3789 (2006).
- 229 Ducourau, E. *et al.* Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* **13**, R105 (2011).
- 230 Meyer, L. H., Franssen, L. & Pap, T. The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 969-981 (2006).
- 231 Wright, J. K., Cawston, T. E. & Hazleman, B. L. Transforming growth factor beta stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1094**, 207-210 (1991).
- 232 Yoshihara, Y. *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **59**, 455-461 (2000).
- 233 Abeles, A. M. & Pillinger, M. H. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **64**, 20-24 (2006).

- 234 Brennan, F. M. *et al.* Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy. *Br J Rheumatol* **36**, 643-650 (1997).
- 235 Ito, A. & Nagase, H. Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase. *Arch Biochem Biophys* **267**, 211-216 (1988).
- 236 Clark, I. M., Powell, L. K., Ramsey, S., Hazleman, B. L. & Cawston, T. E. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **36**, 372-379 (1993).
- 237 Manicourt, D. H., Fujimoto, N., Obata, K. & Thonar, E. J. Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of antigenic keratan sulfate and systemic parameters of inflammation. *Arthritis Rheum* **38**, 1031-1039 (1995).
- 238 Mamehara, A. *et al.* Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci* **56**, E98-107 (2010).
- 239 Posthumus, M. D., Limburg, P. C., Westra, J., van Leeuwen, M. A. & van Rijswijk, M. H. Serum matrix metalloproteinase 3 levels during treatment with sulfasalazine or combination of methotrexate and sulfasalazine in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **29**, 883-889 (2002).
- 240 Young-Min, S. *et al.* Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. *Arthritis Rheum* **56**, 3236-3247 (2007).
- 241 Durez, P. *et al.* A randomised comparative study of the short term clinical and biological effects of intravenous pulse methylprednisolone and infliximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment. *Ann Rheum Dis* **63**, 1069-1074 (2004).
- 242 Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. & Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94**, 2493-2503 (1994).
- 243 Kotani, T. *et al.* Serum levels of matrix metalloproteinase (MMP) 9, a risk factor for acute coronary syndrome, are reduced independently of serum MMP-3 by anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Sci* **120**, 50-53 (2012).
- 244 Koga, T. *et al.* Soluble urokinase plasminogen activator receptor as a useful biomarker to predict the response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Clin Exp Rheumatol* **29**, 811-815 (2011).

- 245 Matsuyama, Y. *et al.* Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1beta signaling and a poor clinical response. *Rheumatol Int* **32**, 1397-1401 (2012).
- 246 Bobbio-Pallavicini, F. *et al.* High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **66**, 302-307 (2007).
- 247 Jonsdottir, T. *et al.* Treatment with tumour necrosis factor alpha antagonists in patients with rheumatoid arthritis induces anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis* **63**, 1075-1078 (2004).
- 248 Voulgari, P. V. *et al.* Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* **92**, 153-160 (1999).
- 249 Brigden, M. L. Clinical utility of the erythrocyte sedimentation rate. *Am Fam Physician* **60**, 1443-1450 (1999).
- 250 Young, B., Gleeson, M. & Cripps, A. W. C-reactive protein: a critical review. *Pathology* **23**, 118-124 (1991).
- 251 Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J. & Fiedel, B. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* **27**, 345-372 (1982).
- 252 Bridges, S. L., Jr. Personalized medicine in rheumatoid arthritis: hopes and challenges. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **65**, 174-177 (2007).
- 253 Fifield, J., Tennen, H., Reisine, S. & McQuillan, J. Depression and the long-term risk of pain, fatigue, and disability in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 1851-1857 (1998).
- 254 Hakkinen, A. *et al.* Pain and joint mobility explain individual subdimensions of the health assessment questionnaire (HAQ) disability index in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**, 59-63 (2005).
- 255 Pruijn, G. J., Wiik, A. & van Venrooij, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **12**, 203 (2010).

